

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie
Oddělení biochemie a fyziologie buňky



**Biologický význam tyrozínové fosforylace v SH3
doméně proteinu CAS**

Radoslav Janoštiak
2010

školitel: RNDr. Jan Brábek, Ph.D.

Prehlasujem, že som predkladanú prácu vypracoval samostatne, na základe konzultácií so svojím školiteľom a s pomocou citovaných literárnych zdrojov.

August 2010

Radoslav Janoštiak

Na tomto mieste by som rád poďakoval svojim školiteľom RNDr. Janovi Brábkovi, Ph.D. a RNDr. Danielovi Röselovi, Ph.D. za odborné vedenie a cenné rady a pripomienky, ktoré mi pomohli pri vypracovávaní tejto práce.

Ďalej by som chcel poďakovať Mgr. Ondřejovi Toldemu za pomoc pri získaní obrázkov pomocou konfokálnej mikroskopie a Mgr. Ondřejovi Šebestovi za pomoc pri FRAP experimentoch.

Obsah:

Obsah.....	4
Zoznam skratiek.....	7
1. Úvod.....	9
2. Literárny prehľad.....	11
2.1. Proteín CAS.....	11
2.2. SH3 doména.....	14
2.2.1. Štruktúra SH3 domény.....	14
2.2.2. Vázbový porvch SH3 domény.....	15
2.2.3. Funkcie SH3 domény.....	17
2.2.4. Tyrozínová fosforylácia v SH3 doméne.....	18
2.3. SH3 doména proteínu CAS.....	19
2.4. Interakční partneri SH3 domény proteínu CAS a funkcie jednotlivých interakcií.....	22
2.4.1. Vázba proteín kináz a proteín fosfatáz a s tým spojená regulácia fosforylačného statusu substrátovej domény proteínu CAS.....	22
2.4.2. Interakcia SH3 domény proteínu CAS s proteínmi CIZ a C3G.....	29
2.4.3. Vplyv SH3 domény proteínu CAS na jeho subbunkovú lokalizáciu.....	30
2.4.4. Úloha proteínu CAS ako senzora mechanického napätia.....	31
3. Materiál.....	34
3.1. Kultivačné médiá a roztoky.....	34
3.2. Materiál použitý pri práci s DNA.....	35
3.3. Roztoky na prípravu lyzátov z cicavčích buniek.....	36
3.4. Materiál použitý pre SDS-PAGE a Western blot.....	37
3.5. Roztoky pre želatínovú zymografiu.....	39
3.6. Materiál použitý pri príprave buniek pre konfokálnu mikroskopiu.....	39
4. Metódy.....	40
4.1. Izolácia plazmidovej DNA alkalickou metódou.....	40
4.2. Izolácia plazmidovej DNA z <i>E.coli</i> pomocou NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Nemecko).....	42
4.3. Transformácia <i>E.coli</i> elektroporáciou.....	42
4.4. Štiepenie DNA restričnými endonukleázami.....	44

4.5. Elektroforéza DNA v agarózovom géle.....	44
4.6. Izolácia fragmentov DNA z gélu pomocou NucleoSpin® Extract 2 in 1 (Macherey-Nagel, Nemecko).....	45
4.7. Ligácia DNA v roztoku.....	45
4.8. Kultivácia tkanivových kultúr.....	46
4.9. Transfekcia cicavčích fibroblastov.....	48
4.10. Príprava proteínových lyzátov z cicavčích buniek.....	49
4.11. Stanovenie proteínovej koncentrácie – Folinova metóda.....	50
4.12. Tris-glycínová SDS-gélová elektroforéza proteínov (SDS-PAGE) s využitím súpravy BIO-RAD mini protean III Cell.....	51
4.13. Western blot (prenos proteínov na membránu pomocou BIO-RAD Trans- blot.....	52
4.14. Imunodetekcia proteínov na membráne.....	52
4.15. Imunohistochemické farbenie cicavčích buniek.....	53
4.16. Pokrývanie sklíčok proteínmi extracelulárnej matrix.....	54
4.17. Želatínová zymografia.....	55
4.18. Migračné eseje.....	56
4.19. Test invazivity.....	58
5. Výsledky.....	60
5.1. Exogénna expresia proteínu CAS v cicavčích bunkách.....	62
5.1.1. Príprava expresných vektorov s vloženým fragmentom DNA kódujúcim proteín CAS.....	62
5.1.2. Príprava línií myších embryonálnych fibroblastov exprimujúcich varianty proteínu CAS.....	63
5.2. Efekt exogénnej expresie proteínu CAS na celkové množstvo fosforylácie proteínov.....	64
5.3. Vplyv mutácie tyrozínu12 v SH3 doméne proteínu CAS na jeho lokalizáciu...67	
5.3.1. Vplyv Y12E mutácie na lokalizáciu CAS v myších embryonálnych fibroblastoch.....	67
5.3.2. Vplyv Y12E mutácie na lokalizáciu CAS v bunkách sarkómovej línie K4.....	69
5.4. Vplyv mutácie tyrozínu 12 na migračný potenciál myších embryonálnych fibroblastov.....	74

5.5. Vplyv mutácie tyrozínu 12 na <i>in vitro</i> invazivitu Src527F transformovaných myších embryonálnych fibroblastov.....	78
5.6. Vplyv mutácie tyrozínu 12 na sekréciu enzýmov degradujúcich proteíny extracelulárnej hmoty.....	80
5.6.1. Sekrécia matrixovej metaloproteázy 2 (MMP2).....	80
5.6.2. In situ degradácia želatínu.....	81
5.7. Vplyv mutácie tyrozínu 12 na dynamiku fokálnych adhézii ako i proteínov v nich obsiahnutých.....	82
5.7.1. Dynamika fokálnych adhézii.....	83
5.7.2. Dynamika proteínov asociovaných s fokálnymi adhéziami.....	85
6. Diskusia.....	90
7. Zhrnutie.....	97
8. Literatúra.....	100

Zoznam skratiek

ATB	Antibiotiká
ATP/ADP	Adenozíntrifosfát/difosfát
BSA	Hovädzí sérum albumín
CCH doména (CAS family	
C-terminal homology doména)	Konzervovaná C-koncová doména u proteínov rodiny CAS
DNA	Kyselina deoxyribonukleotidová
DMEM	Médium pre kultiváciu cicavčích buniek
EDTA	Kyselina etylendiamintetraoctová
EtOH	Etanol
FA	Fokálna adhézia
FAK	Kináza fokálnych adhézií
FBS	Fetálne bovinné sérum
FRAP (Fluorescence Recovery	Návrat fluorescence do laserom vysvietenej
After Photobleaching)	oblasti
GAP (GTPase accelerating protein)	Proteín urýchľujúci inaktiváciu malých G-proteínov
GFP(Green Fluorescence Protein)	Zelený fluorescenčný proteín
GST	Glutation S transferáza
GTP/GDP	Guanozíntrifosfát/difosfát
HLH doména	Helix-loop-helix doména
IRM	Interferenčná reflexná mikroskopia
MEF	Myšie embryonálne fibroblasty
MMP	Matrixová metaloproteináza
PBS (Phosphate buffered saline)	Fosfátový pufor
PTP	Tyrozínová proteín-fosfatáza
SDS-PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza prebiehajúca v SDS pufry
SH2 (Src homology 2)	doména homológna k druhej štruktúrnej doméne kinázy Src

SH3 (Src homology 3)	doména homológna k tretej štruktúrnej doméne kinázy Src
Src527F	aktivovaná varianta kinázy Src – Tyr527 mutovaný za Phe
YFP (Yelow fluorescence protein)	žltá varianta zeleného fluorescenčného proteínu
WT (wild type)	divoká varianta

1. Úvod

Proteín CAS (*Crk-associated substrate*) bol prvý krát identifikovaný ako hlavný tyrozín-fosforylovaný proteín s veľkosťou 130 kDa v bunkách transformovaných onkogénmi v-crk (*Matsuda et al., 1990*) a v-src (*Reynolds et al., 1989*).

CAS je adaptorový proteín, ktorý spolu s dvoma ďalšími proteínmi HEF1 (Human enhancer of filamentation) a Efs/Sin (Embryonal Fyn-associated substrate) tvorí rodinu štruktúrne podobných proteínov. Proteíny tejto rodiny slúžia ako lešenie pre vznik multiproteínových signálnych komplexov. Obsahuje viaceré proteín-proteínové interakčné domény. Na N-konci je to SH3 doména, ktorá viaže prolín bohaté sekvencie (PxxP) tvoriace tzv. polyprolínové helixy proteínkináz FAK, Pyk2/Raftk, proteínfosfatáz PTP-B1, PTP-PEST a iných proteínov (CIZ, C3G, DOCK180 a i.). SH3 doména je nasledovaná krátkym úsekom obsahujúcim prolíny. Za ním je tzv. substrátová doména ktorá obsahuje 15 repetícií YXXP motívu, ktorý je hlavným miestom fosforylácie. Po fosforylácii tyrozínov v substrátovej doméne sú niektoré z týchto motívov rozoznávané SH2 doménami proteínov Crk a Nck. Na C-konci molekuly sa nachádza Src väzbová doména, ktorá viaže kinázy rodiny Src (zhrnuté v (*Chodniewicz and Klemke 2004*)) (obr 1.1.).

Proteín CAS môže byť lokalizovaný v cytoplazme a po aktivácii integrínových receptorov sa presúva do adhesívnych fokov a tyrozíny v YxxP motívoch v jeho substrátovej doméne sú fosforylované (*Fonseca et al., 2003*). Fosforylácia proteínu CAS reguluje reorganizáciu aktínového cytoskeletu a s ním súvisiacich dejov ako uchytenie bunky k podkladu a migrácia (*Honda et al., 1999*). Zúčastňuje sa tiež regulácie bunkového cyklu a prežívania (*Almeida et al., 2000, Oktay et al., 1999*). Nemenej dôležitá je úloha proteínu CAS v reakcii na mechanické napätie, kde hrá CAS rolu primárneho senzora (Sawada et al., 2006). Proteín CAS hrá dôležitú úlohu aj v procesoch onkogénnej transformácie a tvorbe metastáz. Dokazuje to skutočnosť, že pri reexprimovaní proteínu CAS v CAS deficientných bunkách sa výrazne zvýšila ich schopnosť invasivity, pri súčasnom exprimovaní deregulovaného proteínu Src (*Brábek et al., 2004*). Taktiež ľudský homológ proteínu CAS, BCAR1 (Breast Cancer Antiestrogen Resistance 1) , je spoluzodpovedný za odolnosť pacientov s rakovinou prs voči liečbe tamoxifenom (*Brinkman et al., 2000*).



Obr. 1.1. Jednotlivé proteínové domény proteínu CAS a ich interakčný partneri
(Prevzaté z (Tikhmyanova et al., 2007))

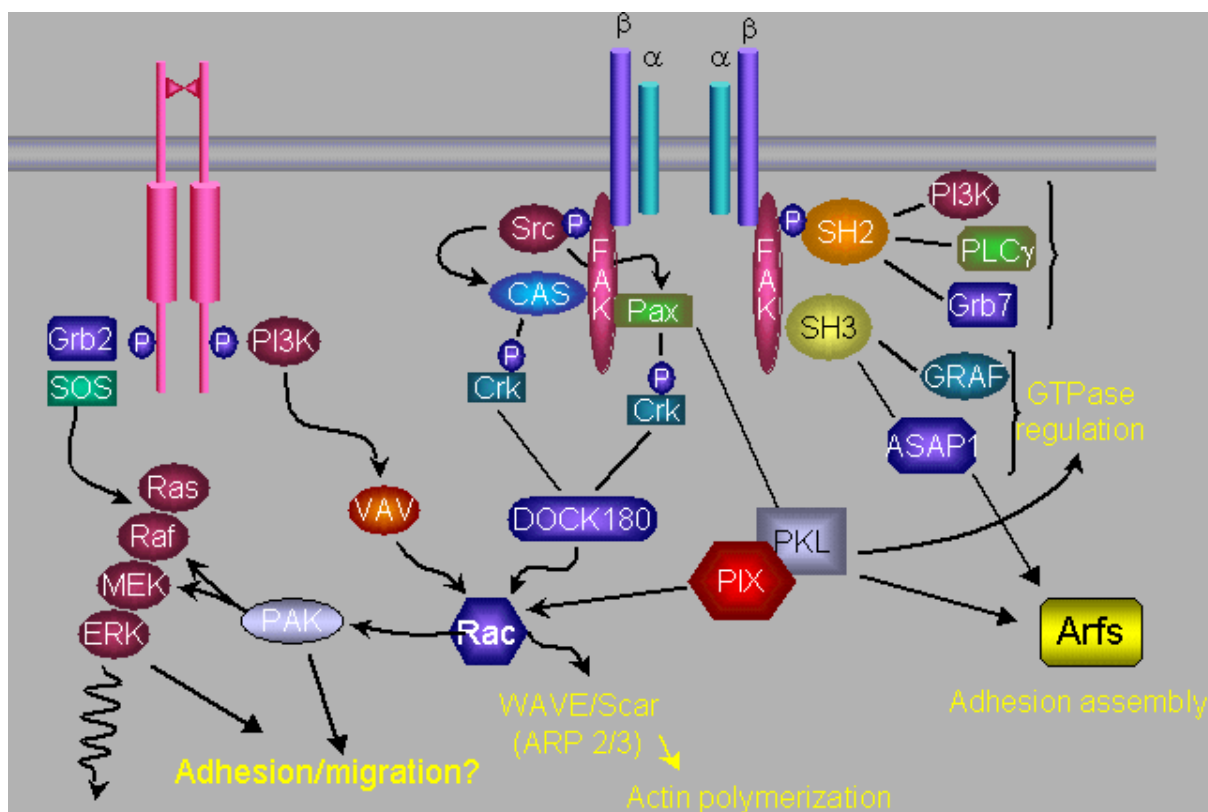
Cieľom tejto diplomovej práce je objasnenie vplyvu fosforylácie tyrozínu 12 v ALYD motíve v N-koncovnej SH3 doméne proteínu CAS na schopnosť interakcie SH3 domény proteínu CAS s polyprolínovými sekvenciami jej prirodzených ligandov a následne analyzovať vplyv prípadnej zmeny väzbovosti na lokalizáciu proteínu CAS a CAS-sprostredkované bunkové deje ako migrácia alebo invazivita.

2. Literárny prehľad

2.1. Proteín CAS

Proteín CAS je dôležitý bunkový proteín. Má nezastupiteľnú úlohu v mnohých bunkových procesoch. Jednou z najdôležitejších funkcií proteínu CAS je regulácia bunkovej migrácie a s tým spojená dynamika cytoskeletu (*Klemke et al., 1998*). CAS je fosforylovaný na tyrozínoch v substrátovej doméne pomocou kináz FAK a Src v závislosti na interakcii s proteínami extracelulárnej hmoty. Aj keď sa CAS väčšinou vyskytuje vo fokálnych adhéziách, nieje kriticky dôležitý pre ich vznik, pretože myšie fibroblasty s deletovaným CAS majú fokálne adhérie masívnejšie, čo naznačuje skôr úlohu v regulácii dynamiky fokálnych adhézii (zhrnuté v (*Tikhmyanova et al., 2009*)).

Fosforylácia tyrozínových zvyškov v substrátovej doméne proteínu CAS je dôležitým regulačným krokom a počiatkom signalizačných dráh vedúcich k ovplyvneniu reakcií bunky na stimuláciu integrínových receptorov ako migrácia či prežívanie. Fosfotyrozíny v substrátovej doméne môžu slúžiť ako väzbové motívy pre SH2 domény ďalších členov signalizačných kaskád. Jedným z najdôležitejších je adaptorový proteín Crk, čo potvrdzuje zistenie že, koexprimovanie CAS spolu s proteínom Crk v COS bunkách výrazne zvýšilo mieru migrácie, pričom táto interakcia je závislá na tyrozínovej fosforylácii substrátovej domény proteínu CAS (*Sakai et al., 1994*). Interakcia CAS a proteínu Crk tak slúži ako „ molekulárny prepínač " pre indukciu bunkovej migrácie (*Klemke et al., 1998*). SH3 doména Crk môže interagovať s proteínom DOCK 180, ktorý indukuje výmenu GDP za GTP na proteíne Rac1. Aktívny Rac1 proteín stimuluje komplex Arp2/3, ktorý indukuje aktínovú polymerizáciu a tým reorganizáciu cytoskeletu čo vedie k membránovým výbežkom a bunkovému pohybu (zhrnuté v (*Raftopoulou and Hall., 2004*)) (obr.2.1.). Ďalšou kinázou, ktorá sa podieľa na fosforylácii substrátovej domény proteínu CAS je kináza rodiny Tec, Bmx/Etk, ktorá asociuje s C-koncovou oblasťou a zvyšuje fosforyláciu substrátovej domény a tiež bunkovú migráciu opäť tým, že napomáha zostaveniu CAS/Crk komplexu (*Abassi et al, 2003*).

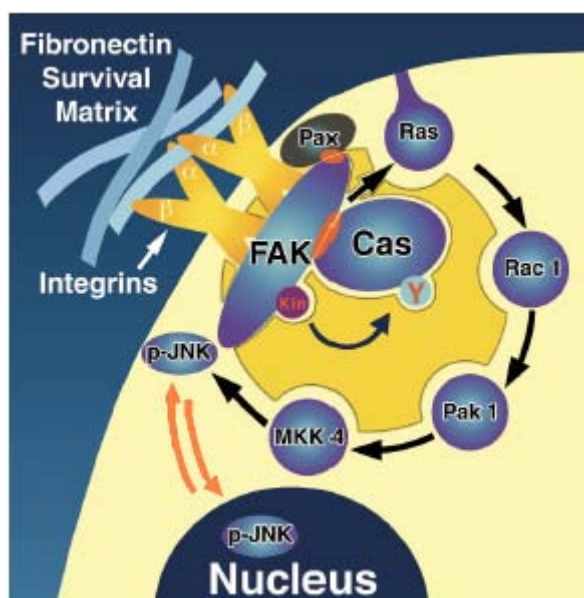


Obr. 2.1. Signálna dráha aktivujúca reorganizáciu cytoskeletu. (prevzaté zo stránky laboratória Thomasa J. Parsonsa, Univerzita Virginia.)
(<http://faculty.virginia.edu/tparsons/research.htm>)

Okrem dobre známej a preštudovanej dráhy zahrňujúcej interakciu CAS-Crk-C3G/DOCK180 sa CAS podieľa na sprostredkovaní promigračných stimulov asociáciou s ďalšími proteínmi. CAS interaguje s proteínmi rodiny zyxin – zyxin, ajuba a TRIP6, ktoré taktiež zvyšujú migráciu a invazivitu (zhrnuté v (Tikhmyanova *et al.*, 2009)).

Nemenej významnou úlohou proteínu CAS je integrácia signálov dôležitých pre prežívanie buniek a účinný prechod cez G1 fázu bunkového cyklu. Signály stimulujúce proliferáciu a prežívanie buniek aktivujú integrínové receptory a následne aj FAK kinázu. Aktivovaná FAK kináza vytvorí komplex s Src a p130CAS tým sa zvyšuje fosforylácia substrátovej domény proteínu CAS. Fosforylácia týchto tyrozínov je signálom, ktorý sa od proteínu CAS prenáša na kinázu JNK a aktivuje ju. Takto aktivovaná JNK následne fosforyluje transkripčné faktory c-Jun a ATF2 a tak reguluje AP-1 závislú transkripciu. (Almeida *et al.*, 2000, Oktay *et al.*, 1999) (obr.2.2.). Prenos tohto signálu od fosforylovanej substrátovej domény zabezpečuje opäť

proteín Crk, viažuci sa na fosfotyrozíny pomocou SH2 domén, ktorý môže interagovať s proteínmi DOCK180, C3G, mSOS, ktoré sa tým aktivujú a navodia výmenu GDP za GTP vo svojich cieľových proteínoch. DOCK180, mSOS a čiastočne aj C3G (Mochizuki et al., 2000) aktivujú JNK prostredníctvom Ras-Rac1-Pak1-MKK4 dráhy (zhrnuté v Dolfi et al., 1998). Proteín C3G významne aktivuje JNK aj dráhou odlišnou od vyššie uvedenej a tá zahŕňa kinázy rodiny MLK (Mixed Lineage Kinase), konkrétne MLK3 a DLK (Dual Leucine Zipper Kinase) (Tanaka and Hanafusa., 1998). Protein CAS taktiež slúži ako adaptorový proteín pre komponenty ERK1/2 dráhy a podporuje tak prechod cez G1 fázu a proliferáciu (Hakak et al., 1999).



Obr. 2.2. Signálna dráha aktivujúca JNK (prevzaté z (Almeida et al., 2000))

Keďže je CAS zapojený do dráh regulujúcich migráciu a proliferáciu je logické, že má dôležitú úlohu v embryonálnom vývine, ale taktiež v patologických stavoch ako napríklad nádorová progresia. Bolo dokázané, že myšie embryá neexprimujúce proteín CAS zomierajú medzi 11,5 a 12,5 dňami. Tieto myšie embryá zomierajú z dôvodu nedostatočnej cytoskeletárnej siete v kardiomyocytoch, čo zabránilo efektívnemu pumpovaniu krvi do krvného obehu. V histologickom ponímaní bola ukázaná dezorganizácia myofibril a nevyvynuté Z-disky (Honda et al., 1998).

Ľudský homológ proteínu CAS – BCAR1 hrá dôležitú úlohu v rezistencii prsných nádorov k antiestrogénovej liečbe tamoxifenom. Vysoká hladina BCAR1 je spojená s agresívnejšími nádormi, skorším návratom choroby a celkovo nižšou prognózou prežívania. V týchto nádoroch BCAR1 interaguje s HER2/Neu onkogénom, ktorý zvyšuje frekvenciu formácie CAS/Crk komplexu a aktiváciu ERK1/2 vedúcu k zvýšenej invazivite. Ďalším mechanizmom zvyšovania agresivity nádorov môže byť asociácia s proteínom BCAR3 (GTP/GDP výmenný faktor). Komplex BCAR1/BCAR3 je dôležitý pre indukciu expresie cyklínu D1 a tiež zvyšuje Src-závislú bunkovú migráciu (zhrnuté v (*Tikhmyanova et al.*, 2009)).

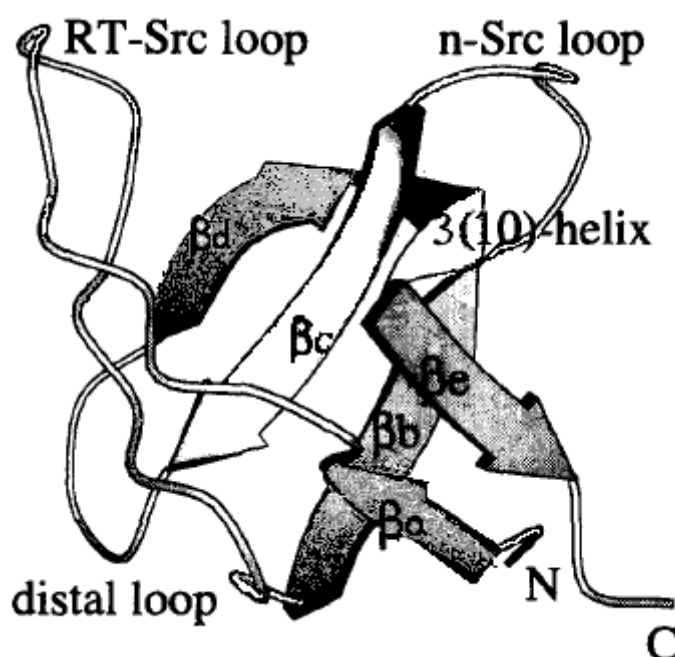
2.2. SH3 doména

SH3 (Src homology domain 3) doména je dôležitá proteínová doména, ktorú spravidla tvorí 60-85 aminokyselín. Bola identifikovaná ako konzervovaná sekvencia na nekatalytickom N-konci tyrozínovej kinázy Src (*Meyer et al.*, 1998). Následným porovnávaním sekvencií proteínkinázy Src s onkogénnym produktom Crk, fosfolipázou C – γ , α -spektrínom, myozínom IB a kvasinkovými proteínmi Cdc25 a Fus1 sa zistilo, že daná sekvencia je konzervovaná v širokom spektre proteínov. Bola nájdená v proteínoch jednobunkových organizmov ako kvasinky, ale taktiež v proteínoch bezstavovcov a stavovcov, čo poukazuje na dlhú evolučnú históriu SH3 domény. Proteíny obsahujúce túto doménu hrajú dôležitú úlohu v širokej škále biologických procesov (*zhrnuté(Musacchio et al.*, 1994)).

2.2.1. Štruktúra SH3 domény

Základná štruktúra SH3 domény je vo všetkých proteínoch približne rovnaká. Je to anti-paralelný β -barel zložený z dvoch β -listov, z ktorých jeden pozostáva z troch reťazcov a druhý z dvoch až troch v závislosti od konkrétnej SH3 domény. β – listy tvoriace SH3 doménu sú zložené proti sebe v približne 90° uhle. Prvý sa skladá z reťazcov β A, a β E a druhý z reťazcov β B, β C a β D. Je to globulárna doména s priemerom okolo 30 Å. N-koniec a C-koniec sú v blízkosti ako je očakávané pre štruktúrne nezávislý modul. Na N-konci SH3 domény sa nachádza krátky β A reťazec,

ktorý je spojený s β B reťazcom pomocou tzv. RT-slučky, ktorá pripomína nepravidelnú antiparalelnú β – vlásenku a je stabilizovaná rozsiahlou sieťou vodíkových mostíkov v samotnej vlásenke, ale tiež medzi vlásenkou a jadrom SH3 domény. V RT-slučke sa nachádza vysoko konzervovaná aminokyselinová sekvencia ALYDY (u proteínu CAS je táto sekvencia pozmenená na ALYDN). β B reťazce v SH3 doménach spektrínu, kináz Fyn, Src a fosfolipázy C – γ sú rozdelné na dve polovice, β B1 a β B2, a podieľajú sa na tvorbe rôznych β – listov. β B2 a β C reťazec spája krátka n-Src slučka. Reťazce β C a β D spája tzv. distálna slučka (vzdialená od väzbového miesta SH3 domény). Konzervovaným prolínom v pozícii 51 začína obrátka 3_{10} helixu, ktorá spája β D a β E reťazec (obr.2.3.). Celá štruktúra je stabilizovaná hydrofóbnymi interakciami medzi jednotlivými β – listami, pričom hlavnú úlohu hrajú postranné reťazce aminokyselinových zvyškov v pozíciách 4, 6, 18, 20, 26, 28, 50, a 55 (číslovanie pre Src SH3 doménu) (Musacchio et al., 1994, Agrawal et al., 2002).



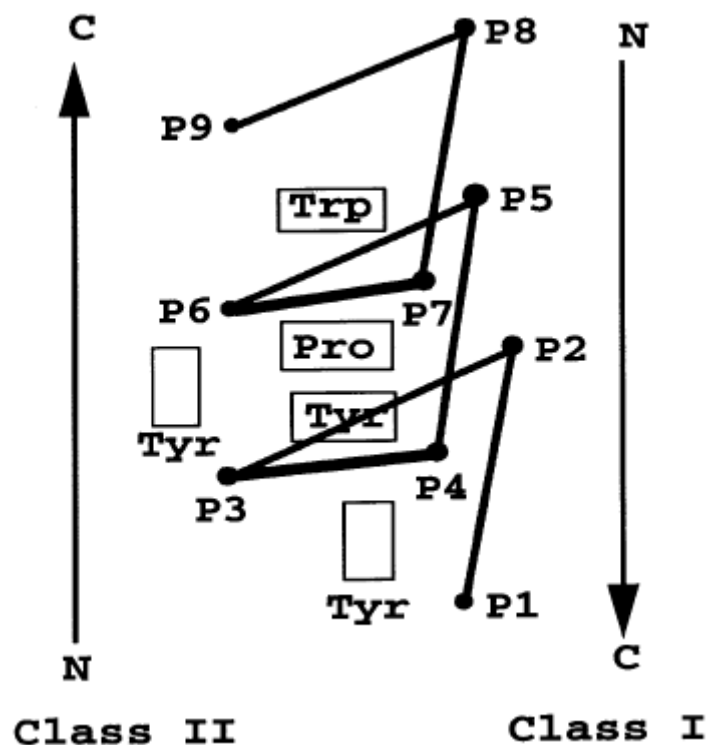
Obr. 2.3. Topológia SH3 domény vyobrazená pomocou programu MOLSCRIPT
(Prevzaté a upravené z (Musacchio et al., 1994))

2.2.2. Väzbový povrch SH3 domény

Pre tvorbu sekundárnej štruktúry SH3 domény sú kriticky dôležité konzervované aminokyselinové zvyšky. Mnohé z týchto zvyškov sú lokalizované vo

vzájomnej blízkosti, čo ich predurčuje k tvorbe väzbového miesta pre ligand (Musacchio *et al.*, 1992). Dôležité sú najmä aromatické aminokyseliny tyrozín a tryptofán v pozíciách 8, 36, 49, 54 a tiež prolín v pozícii 51, pričom aminokyselinový zvyšok v pozícii 49 sa líši v jednotlivých v SH3 doménach rôznych proteínov a pravdepodobne moduluje afinitu konkrétnej SH3 domény k cieľovému substrátu (Brooker *et al.*, 1993), (číslované pre Src SH3 doménu). Tieto aminokyseliny tvoria akési lešenie, ktoré je ohraničené n-Src- a RT-slučkami. Celá táto štruktúra, vytvára hydrofóbne kapsy a pripomína sedlo, ktoré je centrálnou časťou ligand väzbového miesta.

SH3 doména rozoznáva ako primárny ligand prolín-bohaté motívy, ktoré majú špecifickú sekvenciu. Tieto polyprolínové peptidy s PxxP motívom (P-prolín, x-hocijaká aminokyselina) tvoria rigídnu sekundárnu štruktúru, tzv. polyprolínový helix typu II (PPII) s obrátkou 3, tzn. že každá tretia aminokyselina okupuje miesto na rovnakej strane tohto helixu (Adzhubei and Sternberg, 1993). Tento peptid presne zapadne do hydrofóbneho žliabku tvoreného konzervovanými zvyškami v SH3 doméne. Polyprolínový helix II sa môže viazať v dvoch orientáciách. Toto je spôsobené tým, že pozícia aminokyselinových postranných reťazcov v priestore v PPII helikálnej konformácii je podobná v oboch orientáciách. Preto sa peptidy môžu viazať na povrch tej istej SH3 domény v orientácii od N-konca k C-koncu (trieda I) alebo naopak od C-konca k N-koncu (trieda II) (Lim *et al.*, 1994) (obr.2.4.). Orientáciu tohto polyprolínového helixu určuje pozícia báze aminokyseliny, zvyčajne lyzínu alebo arginínu, na N- alebo C-konci. Tieto zvyšky interagujú s kyslými aminokyselinami - aspartátom alebo glutamátom, ktoré sú konzervované v RT-slučke vo väčšine SH3 domén, a vytvárajú silné iónové väzby. Špecifitu rozoznávaneho ligandu zvyšujú i sekvencie lemujúce PxxP motív (Agrawal *et al.*, 2002).



Obr. 2.4. Schematický nákras väzbového miesta SH3 domény a ligandu v dvoch rozdielnych orientáciách. (prevzaté z (Agrawal et al., 2002))

2.2.3. Funkcie SH3 domény

SH3 domény sa nachádzajú v proteínoch, plniacich rôznorodé funkcie. Spoločným rysom mnohých proteínov s SH3 doménou je lokalizácia, buď permanentne alebo prechodne, v blízkosti vnútornej strany plazmatickej membrány. Toto je spôsobené tým, že SH3 doménu obsahujú najmä niektoré aktín-viažúce proteíny ako spektrín alebo kortaktín. Ďalšie proteíny obsahujúce SH3 domény sú zapojené v organizácii cytoskeletu a množenia u kvasinkových buniek. SH3 domény v proteínoch plnia najmä lokalizačnú funkciu a podieľajú sa na lokalizácii týchto proteínov na membránu poprípade do blízkosti cytoskeletu. Vo vyšších eukaryotických organizmoch sú proteíny obsahujúce SH3 doménu zapojené do signálnych dráh. Tyrozín-kináza Src, PI-3 kináza, fosfolipáza C- γ a RasGAP sú typickými predstaviteľmi signálnych proteínov s SH3 doménou. Ďalšou skupinou proteínov s SH3 doménou sú tzv. adaptorové proteíny, ako Crk alebo Nck, ktoré nemajú enzymatickú aktivitu, majú však väzbové miesta pre komponenty

signalizačných kaskád a tak tvoria akési lešenie pre zostavovanie signalizačných komplexov, pretože mnoho signalizačných proteínov obsahuje taktiež prolín-bohaté úseky, ktoré fungujú ako ligandy pre SH3 domény (zhrnuté v *Musacchio et al. 1994*).

Nemenej dôležitá je i úloha SH3 domény v intramolekulárnej regulácii. Bolo dokázané, že mutácie v SH3 doméne cytoplazmatických tyrozín kináz ako Src alebo Abl, ktoré narušili intramolekulárne interakcie v daných kinázach, vyústilo do zmeny ich transformujúceho potenciálu, čo indikuje že SH3 domény sú taktiež schopné regulovať kinázovú aktivitu (*Erpel et al., 1995, Brabek et al., 2002, Meyn et al., 2006*)

2.2.4. Tyrozínová fosforylácia v SH3 doméne.

V eukaryotických bunkách je fosforylácia proteínov jednou z najbežnejších regulačných modifikácií. Je to vlastne enzymaticky katalyzovaný prenos γ -fosfátovej skupiny ATP na hydroxylovú skupinu serínu, treonínu alebo tyrozínu. Fosforylácia je jednosmerný dej pre veľké množstvo energie uvolnenej pri rozštípení fosfodiesterovej väzby v ATP. Naopak fosfátovú skupinu z proteínu odštepujú proteín fosfatázy. Fosforylácia a defosforylácia proteínov boli objavené v štúdiu zaoberajúcej sa metabolizmom glykogénu, presnejšie glykogén fosforylázou (*Fisher et al., 1955*).

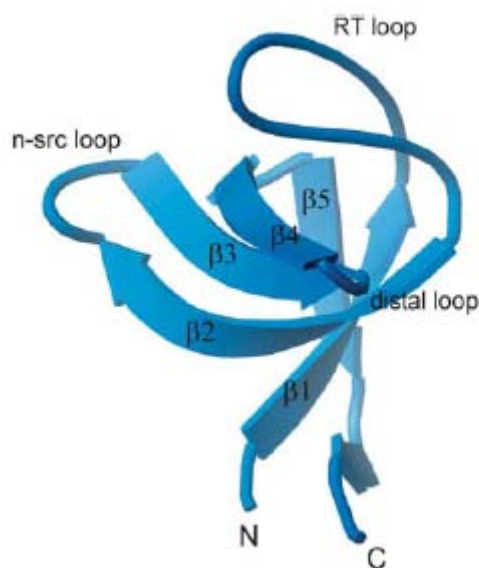
Na vazbovom povrchu SH3 domén sa nachádzajú konzervované tyrozínové zvyšky, ktoré sú dôležité pre sekundárnu štruktúru celej SH3 domény. Tieto tyrozíny zároveň tvoria aj väzbové miesto pre ligand. Mutovaním jednotlivých tyrozínov bola dosiahnutá zmena špecificity a sily väzby ligandu jednotlivých SH3 domén (zhrnuté v (*Agrawal et al., 2002*)). Keďže bežným regulačným mechanizmom v eukaryotických bunkách je fosforylácia, naskytla sa otázka, či fosforylácia špecifických tyrozínov v SH3 doméne môže spôsobiť zmenu väzbových schopností a tým ovplyvniť dráhu regulovanú príslušným proteínom s SH3 doménov. Jednou skupinou proteínov, ktorých aktivita je regulovaná fosforyláciou v SH3 doméne sú tyrozínové kinázy rodín Src alebo Tec. Mutácia Y90 v SH3 doméne kinázy Src za alanín vyústila do zrušenia väzby so Sam68 proteínom alebo regulačnou podjednotkou PI3 kinázy, p58 α (*Erpel et al., 1995*). K podobný výsledkom sa dospelo aj v našom laboratóriu, pričom bolo dokázané že mutácia Y90 za

fosfomimikujúci glutamát mala za následok zrušenie interakcie s proteínmi FAK, p130Cas, STAT3 a iné (zhrnuté v diplomovej práci M.Sztacha 2009).

U kináz rodiny Tec (Btk, Tec, Itk/Tsk/Emt, Bmx a Rlk/Txk) hrá fosforylácia v SH3 doméne tiež dôležitú úlohu. Pri ich aktivácii dochádza k fosforylácii tyrozínu v aktivačnej slučke a následne sú fosforylované tyrozíny v SH3 doméne. Bolo dokázané, že fosforylácia homologických konzervovaných tyrozínov u kináz rodiny Tec (Btk –Y233, Itk – Y180, Bmx – Y215) bola schopná modulovať ich aktivity (*Nore et al.*, 2003). Okrem vyššie spomenutých kináz rodín Src a Tec sa tyrozínová fosforylácia v SH3 doméne objavuje i u adaptorových proteínov ako sú EndofilínA2, Grb2, Grap2 (Wu *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2006), kde znižuje asociáciu ich SH3 domén s ich prirodzenými ligandami a taktiež pri významnom onkoproteíne – kináze Bcr/Abl (*Meyn et al.*,2006).

2.3. SH3 doména proteínu CAS

Zloženie SH3 domény proteínu CAS je analogické zloženiu ostatných SH3 domén. SH3 doména proteínu CAS sa skladá z piatich anti-paralelných β – reťazcov zostavených do dvoch kolmých β -listov. Každý β -list pozostáva z troch reťazcov – najdlhší $\beta 2$ reťazec prispieva rozdielnymi segmentmi do oboch β -listov. Prvý sa skladá z reťazcov $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$ a druhý z $\beta 2$, $\beta 3$, a $\beta 4$. Na C-konci sa podľa štandardnej definície úsekov na SH3 doméne, nachádza ešte $\beta 6$ reťazec (obr 2.5.). V RT-slučke sa nachádzajú najviac konzervované aminokyselinové zvyšky, medzi ktorými Tyr10 (v ALYD motíve-analogický Tyr12 v myšom proteíne p130Cas) a Glu19 (číslované pre ľudský CAS) sú zapojené v interakcii SH3 domény a polyprolínového ligandu (Wisniewska *et al.*, 2005). Práve Tyr12 (u ľudského proteínu CAS : Tyr10) bol identifikovaný ako miesto tyrozínovej fosforylácie v SH3 doméne proteínu CAS (Luo *et al.*, J Proteome Res. 2008).



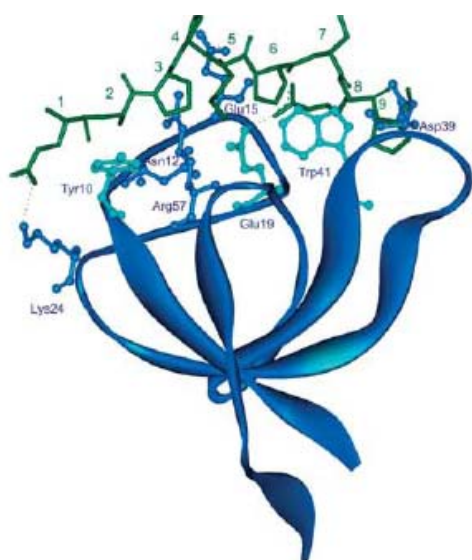
Obr. 2.5. Stuhový model štruktúry SH3 domény proteínu CAS
(prevzaté z (Wisniewska et al., 2005))

RT- a n-Src- slučky tvoria ligand-väzbové miesto, čo je typické pre SH3 domény všeobecne a sú rozhodujúce pre interakcie medzi ligandom a SH3 doménou. Najviac konzervované zvyšky sú Lys9, Tyr10, Glu19, Trp41 a Pro54 (číslované pre ľudský CAS), ktoré sa nachádzajú v hydrofóbnom peptid-viažúcom žliabku. Ako bolo uvedené vyššie, SH3 domény majú väzbové miesto pre polyprolínové ligandy, ktoré nadobúdajú špecifickú konformáciu tzv. polyprolínový helix II. Ten sa môže viazať v dvoch možných orientáciách a závisí to od umiestnenia kladne nabitých aminokyselín v závislosti od PxxP motívu. Prirodzené ligandy SH3 domény proteínu CAS majú pozitívne nabitú aminokyselinu umiestnenú na C – konci polyprolínového motívu, takže sa do SH3 domény viažu v orientácii od N-konca k C-koncu (Wisniewska et al., 2005).

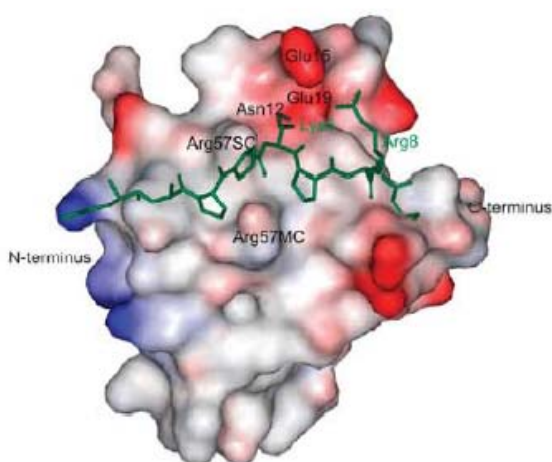
Experimentálnym modelom peptidu, ktorý spĺňa väzbový konsenzus pre proteín CAS, bol peptid odvodený do kinázy FAK (sekvencia EAPPKPSRP). Pre interakciu peptidu s CAS proteínom sa ukázal ako kriticky dôležitý konzervovaný Trp41. Výmena tryptofánu za lyzín znížila afinitu o jeden rád. Tento peptid viažu tri relatívne oddelené väzbové miesta v peptid väzbovom žliabku. Do prvého sa viaže AlaFP2-ProFP3 (FP – FAK peptid) a do druhého LysFP5-ProFP6. Vo všetkých známych štruktúrach SH3 domén majú tieto väzbové miesta hydrofóbný a aromatický charakter. U SH3 domény proteínu CAS je architektúra väzbového miesta podobná,

ale chemický charakter rozdielny. Je to spôsobené jedinečnou výmenou konzervovaného tyrozínu v pozícii 12 za asparagín (motív ALYDN¹²) a výmenou tyrozínu v pozícii 57 za arginín. Dôležitú úlohu hrá aminokyselina v pozícii 15, ktorá je vysoko variabilná medzi SH3 doménami. V SH3 doméne proteínu CAS je to zriedkavo sa vyskytujúci glutamát. Ten svojím záporným nábojom vyvažuje kladný náboj na Arg57 a dovoľuje viazať sekvenciu PXXP pomocou polárnych interakcií medzi lyzínom a sieťou vytváranou okrem iných aj aminokyselinami Asn12, Glu15 a Arg 57 (obr.2.6.). Toto prispieva k selektivitě SH3 domény proteínu CAS. Tretie väzbové miesto vykazuje vysokú štruktúrnu diverzitu. Vďaka tomu sa zdá, že hrá rozhodujúcu úlohu v špecificite väzby. V SH3 doméne proteínu CAS je tvorené tryptofánom v pozíciách 41 a 55, záporne nabitým glutamátom v pozícii 19 a serínom v pozícii 16. Dôležitou interakciou je iónová interakcia medzi arginínom v peptidovom ligande a konzervovaným glutamátom v pozícii 19 v SH3 doméne. Zdá sa, že táto interakcia je podstatným špecifickým determinantom pre väzbu bunkových proteínov s SH3 doménou. Pri experimentoch s FAK peptidom predĺženým na C- konci sa zistilo, že tento peptid sa viaže na SH3 doménu s ešte väčšou afinitou, čo naznačuje, že aminokyseliny obklopujúce PxxP motív sú tiež dôležité pre proteín-peptid interakciu. Tieto lemujúce zvyšky sa viažu k menej konzervovaným úsekom na povrchu SH3 domény, pričom zvyšujú aj sekvenčnú špecificitu. (*Wisniewska et al., 2005*).

A



B



Obr. 2.6. Model väzby FAK peptidu a SH3 domény proteínu CAS.

A Peptidové zvyšky zobrazené zelene a zvyšky zapojené do interakcie s peptidom na SH3 doméne zobrazené modro a vysoko konzervované modro zelene.

B Väzbové rozhranie komplexu SH3 domény CAS-u a FAK peptidu– FAK peptid zobrazený zelene a povrch SH3 domény zobrazený v rôznych farbách v závislosti na náboji (biele plochy – neutrálne aminokyseliny, červené plochy – negatívne nabité aminokyseliny, modré plochy – pozitívne nabité aminokyseliny.(prevzaté a upravené podľa (Wisniewska et al., 2005))

2.4. Interakční partneri SH3 domény proteínu CAS a funkcie jednotlivých interakcií.

Ako bolo v úvode spomenuté, proteín CAS hrá dôležitú úlohu v regulácii mnohých bunkových procesoch. Podieľa sa na integrínovej signalizácii a prenose signálu od receptorov na bunkovom povrchu ďalej do vnútra bunky. Funkčne je spojený s organizáciou aktínového cytoskeletu a tým i s reguláciou bunkového pohybu a taktiež sa zúčastňuje kontroly proliferácie, bunkového cyklu a prežívania. Hlavným spôsobom prenosu informácie je tyrozínová fosforylácia a defosforylácia jeho substrátovej domény (zhrnuté v (Defilippi et al 2006)).

Keďže SH3 doména proteínu CAS viaže jednak proteín-tyrozín kinázy aj proteín-tyrozín fosfatázy, podieľa sa významne na regulácii fosforylačného stavu substrátovej domény a s tým spojených bunkových odpovedí. Narušenie tejto regulácie môže to mať za následok onkogénnu transformáciu. SH3 doména sa podieľa aj na lokalizácii proteínu CAS do fokálnych adhézii a tiež atrahuje niektoré z interakčných proteínov k signálnym komplexom formovaným tesne pod bunkovou membránou (Vuori et al., 1996, Nakamoto et al., 1997). S lokalizáciou proteínu CAS do fokálnych adhézii súvisí aj jeho funkcia ako senzora mechanického napätia (Sawada et al., 2006)

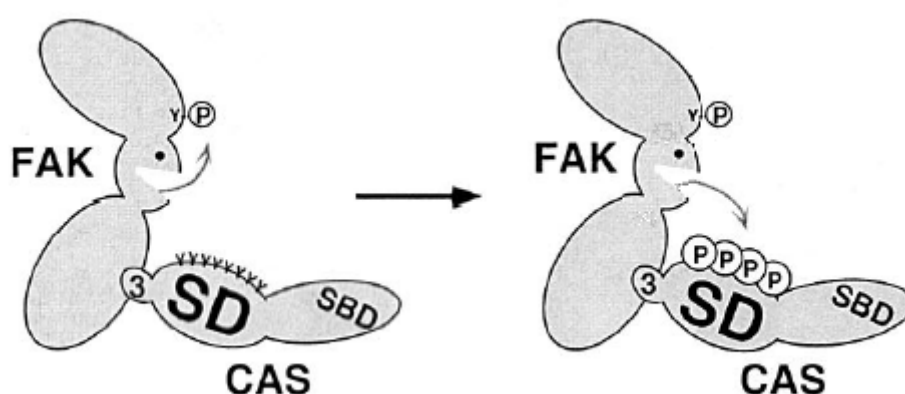
2.4.1. Väzba proteín kináz a proteín fosfatáz a s tým spojená regulácia fosforylačného statusu substrátovej domény CAS.

Keďže fosforylácia substrátovej domény CAS je dôležitým medzistupňom v prenose signálu od integrínových receptorov, je väzba proteín kináz a proteín fosfatáz jednou z najvýznamnejších funkcií SH3 domény. Pravdepodobne najdôležitejšia interakcia je väzba kinázy FAK (Polte and Hanks,

1995) a štruktúrne a aj funkčne podobnej kinázy Pyk2. Tieto dve kinázy zdieľajú 45 percentnú aminokyselinovú sekvenčnú identitu. FAK kináza obsahuje centrálnu kinázovú doménu lemovanú veľkými N- a C- terminálnymi doménami. Zaujímavosťou je, že FAK neobsahuje žiadne SH2 ani SH3 domény (*Schlaepfer et al 1997*). Proteín-tyrozín kináza FAK patrí do rodiny non-receptorových kináz. Je asociovaná s integrínovými receptormi a je aktivovaná prichytením bunky na proteíny extracelulárnej matrix, ako napríklad fibronektín. Je dôležitým komponentom integrínových signalizačných dráh, ktoré regulujú bunkovú proliferáciu, postup z G₁- do S- fázy bunkového cyklu, bunkovú migráciu a keďže uchytenie bunky na podklad je dôležitý signál pre prežívanie buniek, prenáša i anti-apoptotické stimuly. Kináza FAK je aktivovaná zhlukovaním integrínových receptorov na povrchu bunky. Zhlukovanie a aktivácia integrínových receptorov je aktivačný signál pre FAK, ktorý sa následne autofosforyluje na tyrozíne-397. Fosfotyrozín potom funguje ako väzbové miesto pre SH2 doménu proteín-tyrozín kinázy Src, ktorá fosforyluje tyrozíny 576 a 577 v kinázovej doméne a tým zvyšuje jej katalytickú aktivitu (zhrnuté v (*Hanks et al., 2003*)). Kinetický profil fosforylácie CAS a kinázy FAK je skoro identický, čo značí postupnú aktiváciu týchto dvoch proteínov v závislosti na integrínmi sprostredkovaným bunkovým uchytením (*Nojima et al., 1995*). Asociácia FAK kinázy s proteínom CAS je závislá na interakcii SH3 domény CAS a polyprolínového úseku v kináze FAK. Inkriminovaný prolín-bohatý úsek sa v sekvencii kinázy FAK nachádza v rozpätí pozícií 712 – 718 (*Polte and Hanks, 1995*). Mutácia dvoch kritických prolínov v pozíciách 712 a 715 za alaníny (P712/715A) a exprimovanie takto zmenenej kinázy FAK v CHO bunkách, spôsobilo, že interakcia SH3 domény proteínu CAS a kinázy FAK bola znížená asi o 50 % v porovnaní s asociáciou s nemutovanou kinázou FAK. Spolu so zníženou asociáciou bola znížená i miera fosforylácie substrátovej domény proteínu CAS a tým aj CAS-sprostredkovaná migrácia. Tieto mutácie však neovplyvnili *in vitro* kinázovú aktivitu FAK ani asociáciu s proteínom Src, takže znížená miera fosforylácie bola priamym dôsledkom zníženej asociácie SH3 domény proteínu CAS kinázy FAK (*Cary et al., 1998*).

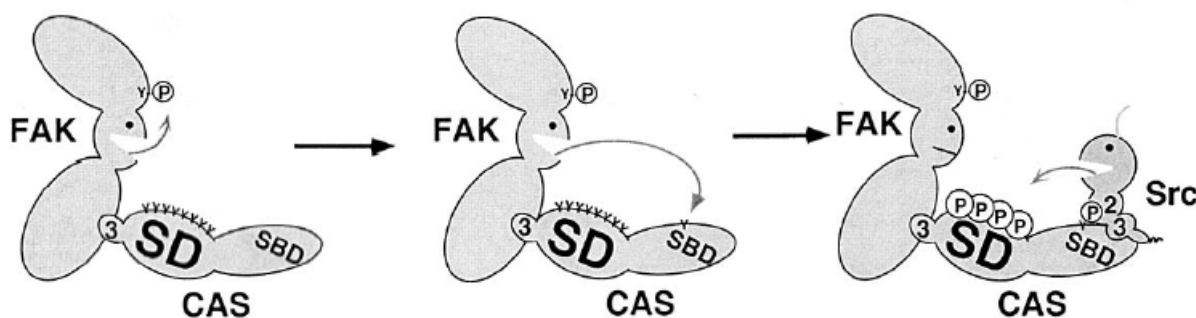
Kináza FAK sa na fosforylácii substrátovej domény proteínu CAS podieľa rôznymi spôsobmi. FAK môže priamo fosforylovať substrátovú doménu aj keď táto cesta fosforylácie nemá vysokú účinnosť (*Tachibana et al., 1997, Ruest et al., 2001*).

Schopnosť kinázy FAK fosforylovať tyrozíny v substrátovej doméne je mierne zvýšená naviazaním SH2 domény kinázy Src na fosforylovaný tyrozín 397, ktorý je si kináza FAK autofosforyluje po aktivácii integrínových receptorov. Potvrďuje to experiment, v ktorom bola v Src deficientných bunkách v suspenzii exprimovaná skrátaná varianta kinázy Src (1-298), ktorá obsahovala len SH2 a SH3 domény. Exprimovanie takto pozmenenej kinázy Src spôsobilo zvýšenie aktivity kinázy FAK, pravdepodobne chránením autofosforylačného Tyr397 pred defosforyláciou fosfatázami (*Schlaepfer et al., 1996*) (obr.2.7.).



Obr. 2.7. Priama fosforylácia substrátovej domény kinázou FAK (prevzaté a upravené podľa (Ruest et al., 2001))

Okrem tyrozínov v YxxP motívoch v substrátovej doméne proteínu CAS, môže kináza FAK priamo fosforylovať ešte aj ďalšie tyrozíny. Sú to tyrozíny v pozíciách 668 a 670 v sekvencii YDYYVHL, nachádzajúce sa v tzv. Src väzbovej doméne. Fosforyláciou týchto tyrozínov sa opäť vytvorí väzbové miesto pre SH2 doménu kináz rodiny Src, predovšetkým pre samotnú kinázu Src. Väzba SH2 domény kinázy Src uvoľní autoinhibičnú interakciu v jej reťazci, čím sa aktivuje a veľmi efektívne fosforyluje substrátovú doménu proteínu CAS. Pri mutovaní oboch tyrozínov v danej sekvencii za fenylalaníny (FDFVHL), priama tyrozínová fosforylácia závislá na FAK bola značne redukovaná v porovnaní s nemutovaným proteínom CAS, čo naznačuje že sekvencia YDYYVHL je hlavným miestom priamej tyrozín-fosforylácie kinázou FAK (*Tachibana et al., 1997*) (obr.2.8.).

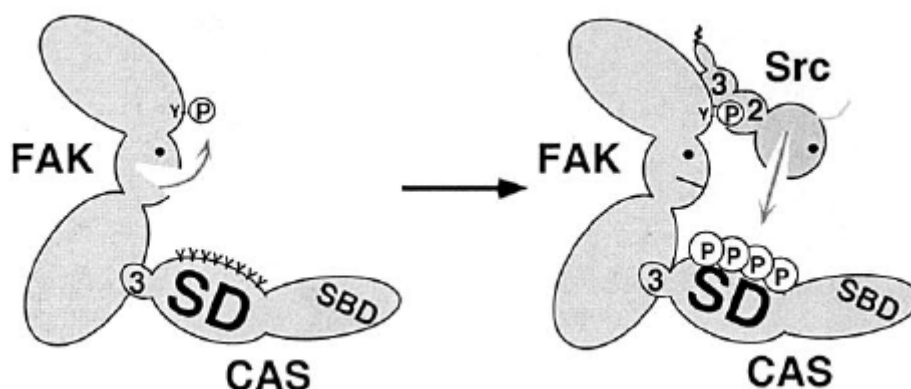


Obr. 2.8. Fosforylácia Src väzbovej domény a následná fosforylácia substrátovej domény kinázou Src. (prevzaté a upravené podľa (Ruest et al., 2001))

Najefektívnejším spôsobom fosforylácie substrátovej domény proteínu CAS je fosforylácia kinázami, ktoré FAK pritiahne do blízkosti proteínu CAS. Jednou z týchto kináz je kináza Src. FAK sa po naviazaní bunky na proteíny extracelulárnej hmoty pomocou integrínových receptorov autofosforyluje na Tyr397 a vytvorí tak väzbové miesto pre SH2 doménu kinázy Src. Táto interakcia spôsobí aktiváciu kinázy Src uvoľnením autoinhibičných intramolekulárných interakcií a takto aktivovaná kináza Src fosforyluje tyrozíny v substrátovej doméne proteínu CAS veľmi efektívne (obr.2.9.). Tento model fosforylácie potvrdzujú experimenty, v ktorých boli COS-7 bunky transfekované expresnými vektormi nesúcimi DNA kódujúcu proteíny CAS, FAK a Src, pričom boli tieto vektory navzájom rôzne kombinované. Pri tranfekcii CAS spolu so samotným FAK alebo CAS so samotnou kinázou Src nebola miera fosforylácie substrátovej domény proteínu CAS výrazne zvýšená. Pričom ak boli bunky transfekované všetkými plazmidmi kódujúcimi FAK, CAS i Src, fosfotyrozínový obsah substrátovej domény CAS stúpol. Ak sa pri exogénnej expresii všetkých troch proteínov použil selektívny inhibítor kinázy Src, fosforylačný status substrátovej domény CAS bol opäť znížený. Rovnaký výsledok bol dosiahnutý pri tranfekcii kinázy FAK, v ktorej bol kritický autofosforylačný tyrozín 397 mutovaný za nefosforylovateľný fenylalanín. Táto zmena zabránila vzniku väzbového miesta pre SH2 doménu kinázy Src a tyrozínová fosforylácia substrátovej domény proteínu CAS bola opäť znížená. Na druhej strane pokiaľ bol transfekovaný mutovaný proteín FAK neschopný tyrozínovej fosforylácie, nenastalo výrazné zníženie fosfotyrozínového statusu substrátovej domény proteínu CAS, pretože kináza Src dokázala nafosforylovať kritický tyrozín 397 v proteíne FAK a vytvorila si tak väzbové miesto

pre vlastnú SH2 doménu. Následnou väzbou na fosfo-tyrozín 397 sa plne aktivovala a fosforylovala aj substrátovú doménu proteínu CAS. Avšak pri použití kinázy FAK, u ktorej boli mutované prolíny 712 a 715 kriticky dôležité pre vytvorenie polyprolínového helixu typu II, ktorý funguje ako ligand pre SH3 doménu proteínu CAS, bol fosfotyrozínový obsah substrátovej domény redukovaný približne na úroveň akú dosahoval pri expresii samotnej kinázy Src s proteínom CAS. Podobný výsledok bol dosiahnutý pri fosforylácii mutovaného proteínu CAS, ktorému chýbala SH3 doména (*Ruest et al., 2001*).

Pri mapovaní hlavných miest fosforylácie proteínu CAS kinázami FAK a Src bolo ukázané, že obe kinázy sú schopné fosforylovať rovnaké tyrozíny v substrátovej doméne proteínu CAS, ale Src má pritom 10-násobne väčšiu efektivitu (*Ruest et al., 2001*).



Obr. 2.9. FAK autofosforylácia, naviazanie kinázy Src pomocou SH2 domény a následná fosforylácia substrátovej domény CAS-u (prevzaté a upravené (*Ruest et al., 2001*))

Pri skúmaní hladiny tyrozínovej fosforylácie v substrátovej doméne proteínu CAS vo FAK deficientných bunkách prisadnutých na fibronektíne bolo zistené, že úbytok fosforylácie nie je až taký masívny ako bolo očakávané v porovnaní s kontrolnými bunkami exprimujúcimi FAK (*Vuori et al., 1996*), čo naznačovalo, že FAK nemusí hrať kritickú rolu v regulácii fosforylácie. Neskôr sa však zistilo, že indukovaná reexpresia kinázy FAK vo FAK deficientných bunkách spôsobila niekoľkonásobné zvýšenie fosforylácie substrátovej domény proteínu CAS v závislosti na integrínovej signalizácii (*Owen et al., 1999*). Menej výraznú zmenu v hladine fosforylácie objasnili ďalšie experimenty, ktoré preukázali, že v bunkách neexprimujúcich kinázu FAK je výrazne nadprodukovaná kináza Pyk2, ktorá zdieľa štruktúrnu aj funkčnú podobnosť s kinázou FAK a samozrejme interaguje s SH3

doménou proteínu CAS (*Sieg et al., 1998*). Pyk2 kináza pravdepodobne do istej miery kompenzuje absenciu FAK a pozitívne ovplyvňuje fosforyláciu substrátovej domény CAS, pričom bolo dokázané, že reexpresia kinázy FAK vo FAK deficientných bunkách blokovala aktiváciu kinázy Pyk2 (*Owen et al., 1999*). Podobné výsledky boli dosiahnuté aj pri experimentoch s mutovaným proteínom CAS. Deletovanie SH3 domény proteínu CAS nespôsobilo rapídne zníženie fosforylačného statusu substrátovej domény, pretože kinázy rodiny Src sa môžu priamo viazať svojimi SH3 doménami na tzv. Src väzbovú doménu na C-konci proteínu CAS a účinne fosforylovať jeho substrátovú doménu. (*Brábek et al., 2005*). Avšak SH3 doména proteínu CAS viaže taktiež aj proteín fosfatázy, ktoré defosforylujú substrátovú doménu. Takže deletovanie SH3 domény znemožnilo naviazanie sa proteín fosfatáz a ich účinkovanie, čo môže mať za následok zvýšenie hladiny fosforylácie. Potvrďuje to zistenie, že pridanie vanadátu, ako špecifického inhibítora tyrozínových fosfatáz, malo za následok rapídne zvýšenie fosfotyrozínového obsahu substrátovej domény proteínu CAS, čo naznačuje, že defosforylovanie tyrozínov v substrátovej doméne CAS fosfatázami je veľmi rýchle a efektívne (*Fonseca et al., 2003*). Na druhej strane, dôležitosť SH3 domény v regulácii fosforylácie substrátovej domény proteínu CAS kinázou FAK, dokladuje experiment, v ktorom bola exprimovaná samotná SH3 doména proteínu CAS. Táto exogénne exprimovaná SH3 doména kompetovala o väzbu na FAK s endogénnym proteínom CAS a pôsobila ako dominantne negatívna mutácia, pričom inhibovala migráciu závislú na fosforylácii substrátovej domény CAS (*Cary et al., 1998*).

Ďalšími bunkovými enzýmami, ktoré sa podieľajú na regulácii fosforylačného statusu substrátovej domény proteínu CAS sú proteín fosfatázy. S SH3 doménou proteínu CAS interagujú dve proteín-tyrozín fosfatázy – PTP-PEST a PTP-B1. Proteín fosfatáza PEST má vysokú afinitu k proteínu CAS v *in vivo* aj v *in vitro* systéme (*Garton et al., 1996*). Interakcia medzi proteín-tyrozín fosfatázou PEST a proteínom CAS je sprostredkovaná dvoma mechanizmami. Hlavným spôsobom interakcie je väzba SH3 domény CAS a prolín bohatého úseku v C-terminálnej doméne PTP-PEST. PTP-PEST interaguje s proteínom CAS ešte aj špecifickým rozoznávaním fosforylovaných tyrozínov v substrátovej doméne CAS pomocou svojej katalytickej domény aj keď táto interakcia je menej výrazným prispievateľom k vysokej afinite interakcie proteínu CAS a PTP-PEST. Dôležitosť SH3

sprostredkovanvej interakcie týchto proteínov je skutočnosť, že výmena kritického prolínu v pozícii 337 v sekvencii PTP-PEST za alanín (P337A) a exprimovanie takto mutovanej PTP-PEST v COS bunkách, spôsobila sotva detegovateľnú interakciu týchto dvoch proteínov. Výsledkom tejto mutácie (P337A) bola taktiež signifikantne nižšia účinnosť defosforylácie substrátovej domény proteínu CAS v porovnaní s nemutovanou PTP-PEST. Bol to priamy dôsledok zníženej asociácie SH3 domény CAS-u a PTP-PEST, pretože schopnosť defosforylácie katalytickej domény PTP-PEST zostala na rovnakej úrovni (*Garton et al., 1997*).

Druhou proteín fosfatázou rozoznávajúcou CAS ako svoj substrát je proteín-tyrozín fosfatáza B1, ktorá asociuje s endoplazmatickým retikulom. PTP-B1 je tiež vysoko špecifická voči proteínu CAS. Interakcia CAS proteínu s fosfatázou PTP-B1 je opäť sprostredkovaná SH3 doménou CAS a na prolín bohatým C-koncovým úsekom v PTP-B1, ktorý odpovedá konsenzu väzbovej sekvencie pre SH3 doménu - PxxP. Tak ako pri PTP-PEST, i výmena prolínov v pozíciách 309 a 310 za alaníny v PTP-B1 (PA PTP-B1) významne znížila asociáciu PTP-B1 a proteínu CAS. Pri exprimovaní tejto varianty v 3Y1-*v-crk* transformovaných fibroblastov sa zistilo, že fosfotyrozínový obsah substrátovej domény proteínu CAS nebol znížený, pričom ak sa exprimovala nemutovaná forma PTP-B1 hladina fosforylovaného proteínu CAS bola 3-4 krát nižšia. Pri exprimovaní enzymaticky aktívnej a neaktívnej formy PTP-B1 v 3Y1 netransformovaných alebo 3Y1-*v-crk* transformovaných fibroblastov bolo taktiež dokázané, že asociácia PTP-B1 a proteínu CAS nie je závislá na fosforylačnom statuse, ako je to v prípade PTP-PEST, pretože obe formy boli koprecipitované spolu s proteínom CAS v rovnakej miere (*Liu et al., 1996*). Dôležitosť funkcie PTP-B1 v regulácii fosforylačného statusu proteínu CAS, bola dokázaná aj pri zvýšenej expresii rôznych foriem PTP-B1 v 3Y1-*v-crk* transformovaných fibroblastoch. Zvýšenie expresie nemutovanej formy PTP-B1 spôsobilo defosforyláciu substrátovej domény proteínu CAS, čím sa zrušila asociácia s proteínom v-Crk sprostredkovaná SH2 doménou a fosforylovanými tyrozínmi v substrátovej doméne proteínu CAS, čím sa zvrátil fenotyp *v-Crk* transformovaných fibroblastov. Zvýšenie expresie enzymaticky neaktívnej formy alebo mutantnej formy neschopnej viazať SH3 doménu proteínu CAS (PA PTP-B1) nemalo žiadny efekt. Podobnú supresiu transformácie spôsobilo zvýšenie expresie PTP-B1 vo *v-src* a *v-*

ras transformovaných bunkách, nie však zvýšená expresia PA PTP-B1 (*Liu et al.*, 1997).

2.4.2. Interakcia SH3 domény proteínu CAS s proteínmi CIZ a C3G

SH3 doména proteínu CAS sprostredkúva interakciu CAS i s ďalšími proteínmi. GTP/GDP výmenný faktor C3G aj CIZ obsahujú vo svojej sekvencii polyprolínový úsek, ktorý zodpovedá väzbovému konsenzu pre SH3 doménu proteínu CAS.

GDP/GTP výmenný faktor C3G obsahuje niekoľko prolín-bohatých sekvencií. Väčšina z nich je zodpovedná za interakciu s SH3 doménami proteínu Crk. Za interakciu s SH3 doménou proteínu CAS je zodpovedný iba jeden polyprolínový úsek, ktorý sa nachádza v C-koncovej časti proteínu C3G. Obsahuje sekvenciu APPKPPLP, ktorá je špecifická pre SH3 doménu proteínu CAS a zároveň je odlišná od sekvencií, ktoré sú zodpovedné za väzbu na proteín Crk. Pri výmene dvoch centrálnych prolínov za alaníny alebo pri výmene lyzínu za alanín v tejto sekvencii, nebola pozorovaná žiadna interakcia medzi SH3 doménou proteínu CAS a C3G proteínom. Fyziologický význam tejto interakcie je pravdepodobne v stabilizácii interakcie C3G proteínu s CAS/Crk komplexom, čo naznačuje možnosť, že väzbové motívy pre SH3 domény proteínov CAS a Crk môžu kooperatívne spolupracovať pri väzbe C3G výmenného faktoru (*Kirsch et al.*, 1998). Priama interakcia proteínu CAS a C3G, nezávislá na proteíne Crk, môže byť vysvetlením faktu, že pri zvýšenej expresii proteínu CAS s deletovanou substrátovou doménou, bola blokovávaná JNK aktivácia závislá na fibronektíne, ale nie aktivácia stimulovaná proteínom v-Src (*Dolfi et al.*, 1998).

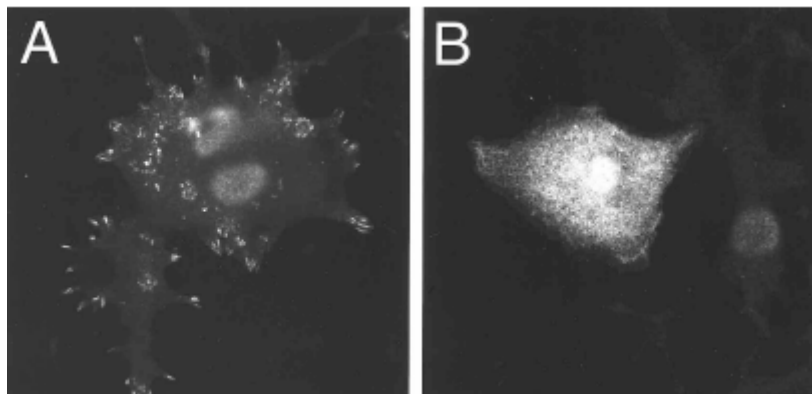
Druhým proteínom interagujúcim s SH3 doménou CAS-u je proteín CIZ. Je to nukleoplazmatický kyvadlový proteín, ktorý obsahuje väzbový konsenzus pre promótor v génoch pre matrixové metaloproteázy (MMPs). Matrixové metaloproteázy sú jednými z hlavných proteáz používaných bunkou na degradáciu proteínov extracelulárnej hmoty. Proteín CIZ aktivuje transkripciu niektorých metaloproteáz napríklad MMP-1, MMP-3 a MMP-7. Obsahuje sekvenciu APPKPPR, ktorú viaže SH3 doména proteínu CAS. Pri simultánnom exprimovaní proteínov CAS a CIZ v CAS deficientných bunkách sa zistilo, že koexprimovanie týchto proteínov

vyvolalo zvýšenie transaktívacie promótoru pre MMP-7 metalloproteázu (*Nakamoto et al., 2000*). Ďalším faktom je, že ak bola exprimovaná mutovaná varianta proteínu CAS, deletovaná o SH3 doménu v SrcF transformovaných bunkách, bola výrazne znížená aktivácia MMP-2 metalloproteázy (*Brábek et al., 2005*). Z tohto vyplýva dôležitosť SH3 domény proteínu CAS i pre exprimovanie a aktiváciu enzýmov degradujúcich extracelulárne proteíny a tým schopnosť buniek migrovať.

2.4.3. Vplyv SH3 domény proteínu CAS na jeho subbunkovú lokalizáciu.

Proteín CAS sa nachádza buď difúzne v cytoplazme alebo vo fokálnych adhéziiach (miesta kontaktu bunky a podkladu). Jeho lokalizácia úzko súvisí s jeho fosforylačným statusom. Nefosforylovaný CAS v 3Y1 bunkách a 3Y1-Crk transformovaných bunkách sa väčšinou vyskytuje v cytoplazme, pričom fosforylovaná forma je lokalizovaná vo fokálnych adhéziiach (*Sakai et al., 1994*). CAS sa vyskytuje vo fokálnych adhéziiach po celú dobu ich života – od vzniku až po zánik (*Donato et al., 2010*). Proteín CAS sa tak nachádza v novovytvorených fokálnych adhéziiach na vedúcom okraji migrujúcej bunky, kde sprostredkuje aktiváciu proteínu Rac1 a tým reorganizáciu cytoskeletu a jednak sa nachádza aj v zrelých fokálnych adhéziiach podopierajúcich bunkové telo, kde pravdepodobne sprostredkuje signály dôležité k prežívaniu bunky (*Fonseca et al., 2003*). Za lokalizáciu proteínu CAS do fokálnych adhézii je vo veľkej miere zodpovedná SH3 doména. Dokazuje to lokalizovanie mutantnej formy proteínu CAS, ktorá neobsahovala SH3 doménu. V 3T3-aSrc a COS-7 bunkách bola táto mutantná forma lokalizovaná vo väčšej miere v cytoplazme pričom nedeletovaná forma sa vyskytovala vo fokálnych adhéziiach (obr.2.10.). SH3 doména proteínu CAS sa viaže s kinázou FAK, ktorá je lokalizovaná taktiež vo fokálnych adhéziiach. Toto je pravdepodobne hlavný spôsob akým sa SH3 doména podieľa na lokalizácii CAS do fokálnych adhézii (*Nakamoto et al., 1997, Harte et al., 2000*). Avšak pre lokalizáciu CAS do FA je dôležitá aj C-koncová oblasť, tzv. CCH doména takže až deletovanie oboch domén spôsobilo úplnú stratu CAS z FA (*Donato et al., 2010*). Ďalším spôsobom regulácie lokalizácie proteínu CAS, môže byť väzba proteín fosfatáz. Over-exprimovanie PTP-PEST vo v-Crk transformovaných potkaních fibroblastoch, zapríčinilo relokalizáciu proteínu CAS z fokálnych adhézii prevažne do cytoplazmy

(*Garton and Tonks, 1998*). Toto mohlo byť spôsobené jednak defosforyláciou substrátovej domény, alebo kompetovaním cytosolicky lokalizovanej PTP-PEST o SH3 doménu proteínu CAS s kinázou FAK (*Garton et al., 1997*).



Obr. 2.10. Lokalizácia proteínu CAS v 3T3-aSrc bunkách.
A., Lokalizácia nemutovaného CAS-u., B., Lokalizácia CAS-u bez SH3 domény
(prevzaté a upravené podľa (*Nakamoto et al., 1997*))

2.4.4. Úloha proteínu CAS ako senzora mechanického napätia.

Mechanické napätie pôsobí ako dôležitý extracelulárny signál, ktorý ovplyvňuje rôzne bunkové deje. Správna odpoveď na mechanické napätie je dôležitá pre množstvo procesov ako sú morfogénéza, karcinogénéza alebo udržiavanie integrity tkanív. Odpoveď na mechanický stres zabezpečujú rôzne signalizačné proteíny ako MAP kinázy, malé GTPázy alebo tyrozínové kinázy či fosfatázy. Taktiež bolo popísaných niekoľko mechanizmov primárneho zaznamenávania signálu – aktivácia iónových kanálov, vytvorenie silou-stabilizovaných väzieb medzi receptorom a ligandom alebo mechanické roztiahnutie cytoplazmatických proteínov (*Sawada et al., 2006*).

Jedným takýmto proteínom je aj proteín CAS, ktorý je zahrnutý v signálnych dráhach regulujúcich migráciu, prežívanie, transformáciu a invazivitu (zhrnuté v (*Defilipi et al., 2006*)). Proteín CAS obsahuje substrátovú doménu, v ktorej sa nachádza 15 opakovaní motívu YxxP, ktorý je hlavným miestom tyrozínovej fosforylácie. Túto fosforyláciu zabezpečujú najmä kinázy rodín Src. Jedným zo signálov spôsobujúcich Src-sprostredkovanú fosforyláciu substrátovej domény proteínu CAS a následnú aktiváciu malej GTPázy Rap1 je mechanické napätie

(*Tamada et al.*, 2004). Priamu aktiváciu GTPázy Rap1 závislú na proteíne CAS dokazuje experiment, pri ktorom bola použitá siRNA proti proteínu CAS výsledkom čoho bolo zníženie aktivácie Rap1 GTPázy sprostredkovanej mechanickým stresom (*Sawada et al.*, 2006).

Spôsobov ako zvýšiť množstvo nafosforylovaných tyrozínov v substrátovej doméne proteínu CAS je niekoľko :

1. aktivácia kinázy

2. inaktivácia fosfatázy

3. mechanické priblíženie kinázy k substrátu

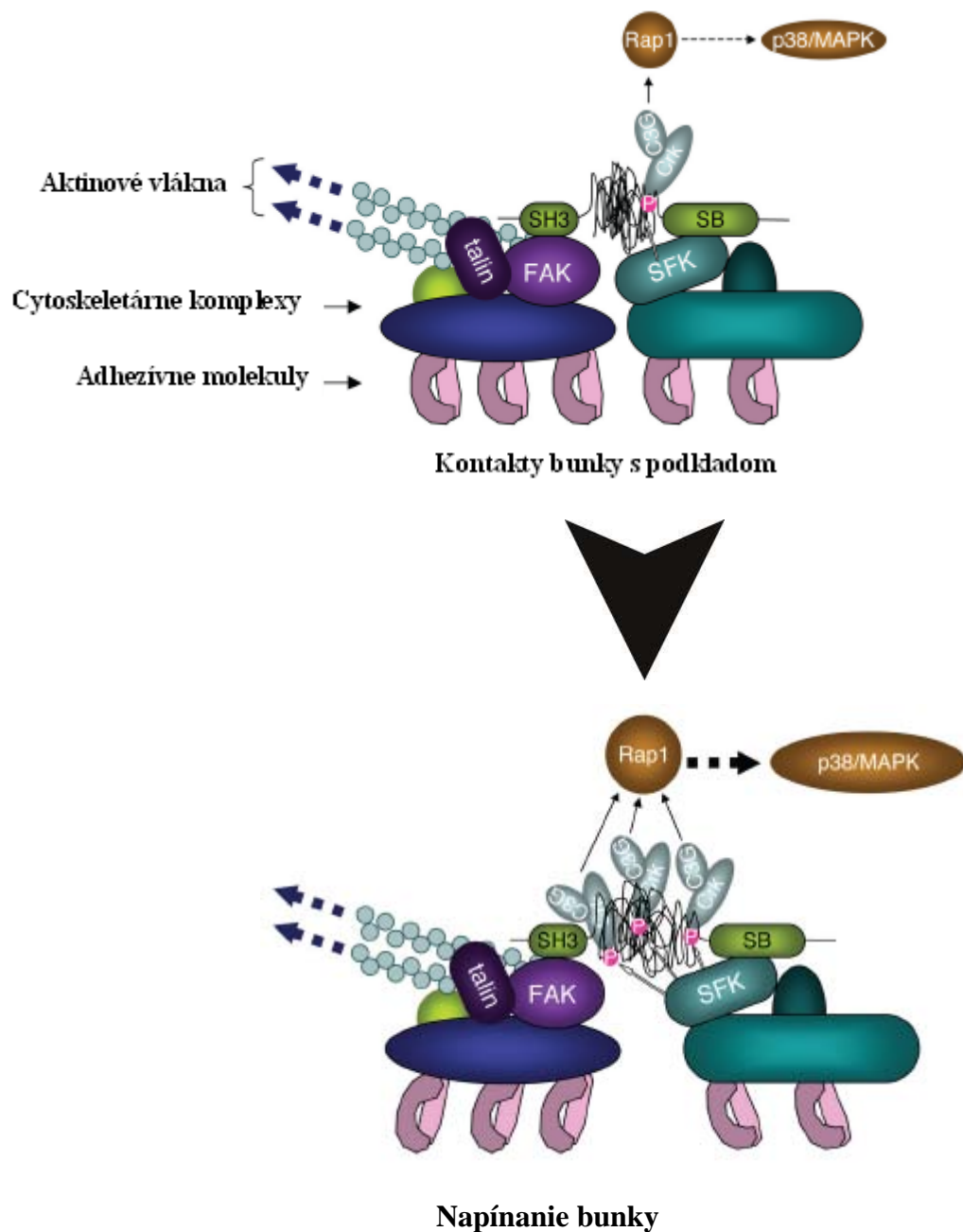
4. zvýšenie prístupnosti substrátu pre fosforyláciu.

Zvýšenie prístupnosti substrátu sa zdá byť najpravdepodobnejším mechanizmom. Pri experimentoch v bunkách HEK293, ktoré boli vystavené mechanickému stresu, bola zaznamenaná zvýšená fosforylácia substrátovej domény p130Cas avšak aktivita Src kinázy nebola zvýšená. Ak bol pri tomto experimente použitý selektívny inhibítor rodiny Src kináz, alebo bol experiment prevedený v SYF bunkách (knock-out Src, Fyn, Yes kináz) zvýšenie fosforylácie substrátovej domény nebolo zaznamenané čo potvrdzuje, že kinázy rodiny Src sú zodpovedné za túto fosforyláciu. Taktiež signál špecifickej protilátky, ktorá rozoznávala natiahnutú substrátovú doménu, bol pozorovaný najmä na okraji rozprestierajúcich sa buniek, kde sú predpokladané vysoké trakčné sily (*Sawada et al.*, 2006).

Pri použití substrátovej domény, ktorá bola biotinylovaná na oboch koncoch a naviazaná na avidín imobilizovaný na latexovej membráne, bolo dokázané, že pri natiahnutí tejto latexovej membrány sa roztiahne aj substrátová doména. Pri tom sa odhalí viac YxxP motívov, ktoré sú potom prístupné na fosforyláciu (*Sawada et al.*, 2006).

Keďže roztiahnutie proteínu CAS v závislosti na mechanickom strese je podmienené jeho ukotvením na membránu (cez interagujúce proteíny), hrá SH3 doména dôležitú rolu, keďže práve ona kotví N-koniec do fokálnych adhézii (*Nakamoto et al.*, 1997). C-koniec môže byť kotvený pomocou kinázy Src cez tzv. Src väzbovú doménu (*Sawada et al.*, 2006), poprípade pomocou kinázy Fyn, ktorá je atrahovaná do fokálnych adhézii v prvých fázach ich tvorby a tiež je kotvená na membránu pevnejšie než Src vďaka dvom palmytoiláciám (*Kostic et al.*, 2006) alebo pomocou dimerizácie p130Cas cez tzv. C- koncovú HLH doménu podobne ako

proteín HEF1, ktorý patrí do tzv. CAS rodiny adaptorových proteínov a zdieľa s ním 75% sekvenčnú zhodu v danej C-koncovej doméne (Law *et al.*, 1999).



Obr.2.11: Model prenosu signálu o mechanickom napätí sprostredkovaný rozpínaním substrátovej domény proteínu p130cas. (prevzaté a upravené podľa (Sawada *et al.*, 2006))

3.Materiál

3.1.Kultivačné médiá a roztoky:

3.1.1. Kultivácia baktérií:

1× LB	10 g/l Universalpepton M66 (MERCK, Germany) 5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK) 5 g/l NaCl
2× LB (Super LB)	20 g/l Universalpepton M66 (MERCK, Germany) 10 g/l Yeast Extract (OXOID, UK) 5 g/l NaCl

ŽA2 4% živný agar č.2 (Imuna, Šarišské Michaľany)

V prípade potreby pridáme selekčné antibiotiká (1000× koncentrované zásobné roztoky pridávame do médií zchladených na cca 50°C):

Ampicilin (Biotika, SR) 100 mg/ml

Kanamycin (AppliChem, Germany) 50 mg/ml

3.1.2. Kultivácia cicavčích buniek:

Kompletné médium DMEM

DMEM (Dulbecco´s modified Eagle´s medium) (Gibco, Invitrogen)

0,5% neesenciálne aminokyseliny (MEM NEAA) (Gibco, Invitrogen)

10% fetálne hovädzie sérum (FBS) (Sigma)

0,5% všeobecné antibiotiká – antimykotiká (ATB) (Gibco, Invitrogen)

- obsahujúce : 10 µg/ml penicilin

10 µg/ml streptomycin

25 µg/ml amphotericin

Ďalšie roztoky používané pri kultivácii cicavčích buniek:

0,25% trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen) 2,5 g/l trypsin 0,38 g/l kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA) pre pasážovanie

Puromycin (Sigma) selekčné antibiotikum puromycin-hydrochlorid, zásobný roztok 10 mg/ ml v miliporovej vode, ku kultúre pridávaný v koncentrácii 3 µg/ml.

3.2. Materiál použitý pri práci s DNA:

3.2.1. Enzymy pre modifikáciu DNA

Ligácia plazmidovej DNA:

T4 DNA ligáza LC (MBI Fermentas)

Restrikčné štiepenie plazmidovej DNA:

BamHI (MBI Fermentas)

BglII (MBI Fermentas)

EcoRI (MBI Fermentas)

Eco47III (MBI Fermentas)

3.2.2. Použité kity pre manipuláciu s nukleovými kyselinami

Purifikácia DNA:

NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, BRD)

NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, BRD)

3.2.3. Roztoky použité pri izolácii plazmidovej DNA:

Alkalické SDS	1% SDS, 0.2M NaOH
Kac	3M octan draselný, 2M kys. octová, pH 4,8-5,4
NaAc	3M octan sodný, pH 5.8
80% EtOH	80% etanol, 10 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl pH 8.0
TE	10 mM TRIS-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA-NaOH
TEG	25 mM TRIS-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA-NaOH, 1% glukóza
LiCl	10 M LiCl, $\rho=1.275$

3.2.4. Materiál pre agarózovú DNA elektroforézu:

Agaróza	Sea Kem a NuSieve (FMC, USA) v pomere 1:1
TAE	40 mM Tris (pH 8,5); 20 mM ledová kyselina octová; 2 mM Na ₂ EDTA
Vzorkový pufr	60% glycerol; 60 mM EDTA; 0,06% bromfenolová modř

3.3. Roztoky na prípravu lyzátoz z cicavčích buniek:

RIPA pufr	0,15M Na Cl; 50mM Tris-HCl (pH 7,4); 1% Nodinet P – 40; 0,1% SDS; 1% deoxycholát sodný; 5 mM EDTA; 50 mM NaF
-----------	---

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH upravené na 7,3
-----	---

Zásobný roztok proteázových inhibítorov (100x):

0,5 mg/ml	leupeptin
0,5 mg/ml	aprotinin
12,5 mg/ml	pefabloc

Zásobný roztok fosfatázových inhibítorov (100x):

Phosphatase Inhibitor Mix II (Serva, Germany)

Vanadát sodný (Na_2VO_4) – 1000x

Priamy lyzát :

2x Laemmli pufr 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,1% SDS; 20%(v/v) glycerol; 0,002% bromfenolová modrá

Dithiotreitol (DTT) – 1:100

3.4.Materiál použitý pre SDS-PAGE a Western blot

2x Laemmli pufr 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,1% SDS; 20%(v/v) glycerol; 0,002% bromfenolová modrá

5x Laemmli pufr : 0,35 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 40% glycerol; 0,012% bromfenolová modrá

Protogel : 30% akrylamid; 0,8% N,N'-methylenbisakrylamidu; prefiltrované cez filter s pórmi 0,45 mm, skladované v tme pri 4°C

4xTris/SDS pH 8,8 : 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4% SDS; prefiltrované cez filter s pórmi 0,45 mm, skladované v tme pri 4°C

4x Tris/SDS pH 6,8 : 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% SDS; prefiltrované cez filter s pórmi 0,45 mm, skladované v tme pri 4°C

TEMED – N,N,N⁹,N⁹,-tetra-methyl-ethylenediamine (Serva)

Amonium persulfát (10 % APS) – $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ (Sigma)

SDS-PAGE pufr: 25 mM Tris (pH 8,3); 190 mM glycín; 0,1% SDS

Odfarbovací roztok: 20% metanol; 7% kys. octová

Farbiaci roztok: 20% metanol; 10% kys. octová; 0,114% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)

Transferový pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycín; 20% metanol; 0,05% SDS

TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 500 mM NaCl

TTBS: 0,05% Tween 20 (Serva) v TBS

Blokovací roztok:

4% BSA (Milipore) v TBS – blokovanie 50-60 minút pri 37°C

3% želatína (Bio-Rad) v TBS – blokovanie 50-60 minút pri 37°C

Roztok pre riedenie primárnej a sekundárnej protilátky:

1% BSA (Milipore) v TTBS

1% želatína (Bio-Rad) v TTBS

Primárne protilátky:

<u>p130Cas</u>	130kDa, 1:1000 mouse monoclonal, BD Transduction Laboratories
<u>pY165 (CAS)</u>	130kDa, 1:1000 rabbit monoclonal, Cell Signaling
<u>pY410 (CAS)</u>	130kDa, 1:1000 rabbit monoclonal, Cell Signaling
<u>pY12 (CAS)</u>	130kDa, 1:1000 rabbit monoclonal, 21st Century Bichemicals
<u>FAK</u>	125kDa, 1:1000 rabbit polyclonal, Santa Cruz
<u>pY397 (FAK)</u>	125kDa, 1:1000 rabbit monoclonal, Biosource
<u>pY861 (FAK)</u>	125kDa, 1:1000 rabbit monoclonal, Biosource
<u>Paxillin</u>	68kDa, 1:1000 rabbit monoclonal, BD Transduction Laboratories
<u>pY118 (Paxillin)</u>	68kDa, 1:1000 rabbit monoclonal, Cell Signaling
<u>v-Src</u>	60kDa, 1:1000 Calbiochem
<u>phospho Tyrosine 4G10</u>	1:100 Upstate Biotechnology

Sekundárne protilátky:

goat anti-mouse, 1:3000 Santa Cruz Biotechnology

goat anti-rabbit 1:3000 Santa Cruz Biotechnology

3.5. Roztoky pre želatínovú zymografiu:

renaturačný pufr:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,1 M NaCl

2,5% Triton X-100

aktivačný pufr:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM CaCl₂

0,02% NaAzide

3.6. Materiál použitý pri príprave buniek pre konfokálnu mikroskopiu:

Fibronectin : 10µg/ml – na sklíčko 100µl, zásobný roztok 1 mg/ ml (Serva)

Želatin (Bio-RAD)

Glutaraldehyd (Liebherr) – zásobný roztok 50% - riedenie na 0,5% v PBS

Paraformaldehyd (Sigma) - zásobný roztok 8% - riedenie na 4% v PBS

AlexaFluor633 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen)

Dimethyl formamid (Sigma)

0,1 M NaHCO₃ – 1M roztok (NaHCO₃ : Na₂CO₃ 9:1)

DABCO - 1,4-diazabicyclo(2.2.2)octane, Sigma

PBS 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄.12 H₂O;

1,4 mM KH₂PO₄, pH upravené na 7,3

Blokovací roztok - 3% BSA v PBS

Permeabilizačný roztok – TritonX-100 0,3% v Mg-PBS

Protilátky a fluorescenčné značky:

Primárne protilátky : phospho-Tyrosine G410 (Temecula) – 1:50
phospho-Paxillin (Cell Signaling) – 1:50
phospho-Cortactin (Invitrogen) – 1:50

Sekundárne protilátky : Alexa Fluor 633 anti-mouse – Molecular Probes
Alexa Fluor 594 anti-mouse – Molecular Probes
Alexa Fluor 546 anti-rabbit – Molecular Probes
Alexa Fluor 408 anti-rabbit – Molecular Probes

Alexa Fluor 488 phalloidin – Invitrogen
Alexa Fluor 594 phalloidin - Invitrogen

Montovacie médium:

6 g glycerol
2,4 g mowiol
6 ml dd H₂O
12 ml pufru (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, pH 8,3)

4. Metódy

4.1. Izolácia plazmidovej DNA alkalickou metódou:

1.deň (popoludní)

- Na plotňu so živným agarom a príslušným selekčným antibiotikom zaočkujeme klon E.coli transformovaný príslušným plazmidom. Kultivujeme cez noc pri 37°C.

2.deň (popoludní)

- Jednou dobre oddelenou kolóniou zaočkujeme 10ml temperovaného LB média s 100 µg/ml selekčného antibiotika (ampicilín/kanamycín) v 100ml Erlenmayerovej banke (resp. 50ml v 250ml banke)

- Banku umiestnime do trepačky a trepeme pri 37°C cez noc (tj asi 16 hodin, 180 rpm)

3.deň (ráno)

- Kultúru schladíme v ľadovom kúpeli, prelejeme do 50 ml centrifugačnej skúmavky a stočíme (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3000g, 20 min. 0°C)
- Sediment dokonale resuspendujeme do x ml TEG (*x vypočítame podľa pôvodného objemu kultúry nasledovne : 1ml na 10 ml kultúry, 2-4 ml na 50 ml kultúry*) a inkubujeme 30 min na ľade
- Skúmavku vyberieme z ľadu, pridáme 2x ml alkalického SDS, premiešame a inkubujeme 5 min. *Bunky lyzujú, suspenzia sa prejasní, výrazne stúpne viskozita.*
- Následne skúmavku opäť prenesieme na ľad a pridáme 1,5x ml octanu draselného, premiešame a inkubujeme ďalších 30-60 minút na ľade. Z roztoku vypadne biela zrazenina.
- Zmes prelejeme do polypropylénových skúmaviek a zrazeninu usadíme centrifugáciou (Jouan MR 22i – uhlový rotor, 14 000g, 20 min).
- Supernatant prevedieme do 15 ml kalibrovanej skúmavky, dokonale zmiešame s 0,6 objemu isopropanolu a hneď centrifugujeme (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3000g, 5 min).
- Supernatant zlejeme, sediment osušíme, rozpustíme v 300 µl miliporovej vody a prenesieme do mikroskúmavky. Odmeráme objem, dokonale zmiešame s rovnakým objemom 10 M LiCl a inkubujeme v -20°C cca 60 minút (-80°C, 15 min).
- Zrazeninu odstránime 5-minútovou centrifugáciou v stolnej centrifúge (Hettich MIKRO 20, 13 000 g) a supernatant prevedieme do čistej mikroskúmavky.
- Plazmidovú DNA vyzrážame z roztoku jedným objemom 96% etanolu 60 min pri -20°C (-80 °C, 15 min).
- Zrazeninu DNA usadíme centrifugáciou (Hettich MIKRO 20, 13000g, 5 min), sediment 2-3x opláchneme 80% EtOH, vysušíme a rozpustíme v 100 µl miliporovej vody (alebo TE pufru). Množstvo DNA a kvalitu izolácie zistíme elektroforeticky.

(materiál : 3.1.1., 3.2.3.)

4.2. Izolácia plazmidovej DNA z E.coli pomocou NucleoSpin®

Plasmid (Macherey – Nagel, Nemecko)

- Kultúru E.coli (max. 5 ml) s daným plazmidom, ktorú sme nechali narásť cez noc (16-18 h) prevedieme do centrifugačnej skúmavky a centrifugujeme (Jouan MR 22 i, 17 000g, 30 s). Supernatant odstránime.
- Pelet nesuspendujeme v 250 µl roztoku A1.
- Pridáme 250µl roztoku A2. Jemne premiešame otáčaním skúmavky a inkubujeme pri izbovej teplote maximálne 5 minút.
- Pridáme 250µl roztoku A3. Jemne premiešame a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 16 000g, 10 min).
- Kolonku NucleoSpin Plasmid umiestnime do čistej 2 ml mikroskúmavky, nanesieme supernatant z predchádzajúceho kroku a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 16 000g, 1 min) a potom odstránime tekutinu zo zbernej mikroskúmavky.
- Pre zbavenie sa bunkových nukleáz sa doporučuje naniesť na kolonku 500µl roztoku AW zohriateho na 50 °C a opakovať centrifugáciu.
- Na kolonku nanesieme 600µl roztoku A4 a opäť centrifugujeme.
- Po odstránení roztoku zo zbernej mikroskúmavky zopakujeme centrifugáciu 2 min maximálnou rýchlosťou (dokonalé odstránenie zvyškov etanolu).
- Kolonku umiestnime do čistej 1,5 ml mikroskúmavky, pridáme 50 µl roztoku AE, inkubujeme 1 min pri izbovej teplote a potom centrifugujeme 1 min na najväčšie otáčky. DNA môžeme eluovať tiež do TE pufru alebo do deionizovanej vody.

4.3. Transformácia E.coli elektroporáciou

4.3.1. Príprava kompetentných buniek pre transformáciu elektroporáciou

1.deň (popoludní)

- Jednou kolóniou čerstvo narastených recipientných baktérií zaočkujeme 10 ml LB média v 100 ml Erlenmayerovej banke.

- Inokulum kultivujeme na rotačnej trepačke pri 37°C do stacionárnej fázy (cez noc, 180 rpm, optická denzita (OD) > 2,5)

2.deň (ráno)

- Kultúrou zaočkujeme 400ml média LB s 0,4 ml thiaminu (0,1 mg/ml) na OD₆₀₀ = 0,05 (2x200 ml média v 2x2 l Erlenmayerových bankách.)
- Banky umiestnime na trepačku (180 rpm, 37°C), kultúru inkubujeme až po dosiahnutie OD₆₀₀ = 0,6. Banku prenesieme na ľad a necháme vychlaďiť 10-15 minút.
- Kultúru prelejeme do dvoch 250 ml vychladených plastových centrifugačných kyvet Nalgene a sedimentujeme centrifugáciou (Janetzki K26, 3000g, 10 min, 0°C)
- Supernatant opatrne zlejeme, sediment najprv pipetou sterilne nesuspendujeme v 10 ml ľadovej deionizovanej vody, potom vodou doplníme na pôvodný objem. Opätovne centrifugujeme, resuspendujeme a doplníme vychladenou vodou na objem 100 ml.
- Bunkové suspenzie prenesieme do štyroch 50 ml centrifugačných skúmaviek a znovu centrifugujeme (Jouan 22i, 3000g, 20 min, 0°C).
- Sedimenty resuspendujeme pipetou v malom množstve 10% (w/w) ľadového glycerolu (1-5 ml), potom glycerolom doplníme na 25 ml, suspenzie spojíme do dvoch skúmaviek a centrifugáciu opakujeme (Jouan 22i, 3000g, 20 min, 0°C)
- Premyté sedimenty resuspendujeme v zvyškovom objeme 10% glycerolu (1-2 ml). Suspenziu pipetujeme po 100 -200µl do 1,5 ml mikroskúmaviek dopredu vychladených v tekutom dusíku, do ktorého potom prechodne odkladáme i naplnené mikroskúmavky. Dlhodobu skladujeme pri -80°C.

(*materiál* : 3.1.1.)

4.3.2. Transformácia elektroporáciou

- Do 0,5 ml mikroskúmavky s 0,5-5 µl roztoku plazmidovej DNA (obsahujúcom 5pg – 0,5 µg DNA) pridáme 50µl elektrokompetentných buniek (všetko robíme na ľade).
- Obsah mikroskúmavky prenesieme do vychladenej 0,2 cm elektroporačnej kyvety. Na generátore pulzu prístroja Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad, USA)

nastavíme tieto hodnoty: kapacitancia 25 μ F, napätie 2,5 kV a odpor 200 Ω . Po vložení kyvety do prístroja aplikujeme pulz s veľkosťou 12, 5 kV/cm. Výsledná časová konštanta by mala byť v rozmedzí 4-5 milisekúnd. Obsah kyvety okamžite resuspendujeme do 2 ml LB média, obsahujúceho 20mM glukózu (cca 0,5 % roztok) a prevedieme do sklenenej 10 ml skúmavky.

- Skúmavku s kultúrou umiestnime na trepačku a necháme rásť hodinu pri 37°C (180-200 rpm). Na plotne s ŽA2 agarom obsahujúcim selekčné antibiotikum vysievame obvykle 2, 20 a 200 μ l kultúry. Plotne inkubujeme v termostatu pri 37°C cez noc.

(*materiál* : 3.1.1.)

4.4. Štiepenie DNA reštrikčnými endonukleázami

- V 0,5 ml mikroskúmavke pripravíme nasledujúcu reštrikčnú zmes :

10x reštrikčný pufr	2 μ l (1/10 výsledného objemu)
vzorka DNA v H ₂ O	x μ l (0,1 – 4 μ g DNA)
deionizovaná voda	doplniť do objemu 20 μ l
- V závislosti na štruktúre a čistote vzorky pridávame 1-10 U enzemu / μ g DNA.
- Inkubujeme 1-4 hodiny pri optimálnej teplote štiepenia, potom reakciu zastavíme pridaním vzorkového pufru alebo ochladením zmesi na -20°C, prípadne zahriatím 20 min, 65°C.
- Množstvo a kvalitu štiepenej DNA zistíme pomocou elektroforézy v agarózovom gele.

(*materiál* : 3.2.1.)

4.5. Elektroforéza DNA v agarózovom géle.

Elektroforézu vykonávame v aparáte pre horizontálnu gélovú elektroforézu v pufre 1x TAE. Dĺžka gélov je 6-10 cm a hrúbka 3-5 mm, vzdialenosť elektrod 14 cm. Pre delenie fragmentov väčších než 800 bázových párov (bp) používame 1% agarózové gély, pre delenie kratších fragmentov používame 2% agarózové gély tvorené zmesou Sea Kem agarózy a NuSieve agarózy (FMC, USA) v pomere 1:1. Do jamiek

s rozmermi 4-15 x 2 mm nanesieme 6-50µl vzorku, obsahujúceho 10ng-2µg DNA. K vzorkám pridávame vzorkový pufo (1/5 celkového objemu) obsahujúci bromfenolovú modrú pre odhad polohy delených fragmentov behom elektroforézy. Deliace napätie volíme v rozmedzí 0,5 – 10V/cm. Elektroforézu ukončíme v dobe, keď bromfenolová modrá prekoná vzdialenosť dostatočnú pre delenie fragmentov DNA. Gél potom ofarbíme v roztoku ethidium bromidu (0,5 µg/ml) po dobu 10 min. Gél fotografujeme s červeným filtrom v prechádzajúcom ultrafialovom (UV) žiarení (300-310 nm).

(*materiál* : 3.2.4.)

4.6. Izolácia fragmentov DNA z gélu pomocou NucleoSpin®

Extrakt 2 in 1 (Macherey – Nagel, Nemecko)

- Čistým skalpelom vyrežeme oblasť gélu s požadovaným fragmentom DNA, preniesieme do skúmavky a zvážeme.
- Na každých 100mg pridáme 300µl roztoku NT1
- Vzorku inkubujeme pri 50°C až kým sa agaróza nerozpustí (5-10 min).
- Vzorku krátko vortexujeme každé 2-3 minúty.
- NucleoSpin Extract kolonku umiestnime do mikroskúmavky, nanesieme vzorku a centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 11000 g, 1 min).
- Pridáme 600 µl roztoku NT3 a opäť centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 11000 g, 1 min).
- Pridáme 200µl roztoku NT3 a opäť centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 11000g, 2 min) tak aby sme roztok NT3 úplne odstránili.
- Kolonku umiestnime do čistej mikroskúmavky, nanesieme 25 – 50 µl elučného pufru alebo deionizovanej vody, necháme stáť 1 min pri izbovej teplote a potom centrifugujeme (Hettich MIKRO 20, 11000g, 1 min).

4.7.Ligácia DNA v roztoku

- V 0,5 ml mikroskúmavke namiešame reakčnú zmes:

10x ligačný pufor (MBI Fermentas)	1 µl (1/10 objemu)
DNA vektor a inzert v molárnom pomere 1:3-4	(0,1 – 10 mM)
T4 DNA ligáza (MBI Fermentas)	0,2 µl (0,08 U)
deionizovaná H ₂ O	doplniť do 10 µl

- Ligačnú zmes inkubujeme 2-4 hodiny pri laboratórnej teplote.
- Pre zvýšenie účinnosti reakcie môžeme preniesť ligačnú zmes do vodného kúpeľa s laboratórnou teplotou, premiestniť do chladničky a nechať ligovať cez noc.
- Ligázu inaktivujeme zahriatím na 65°C po dobu 15 min.
- 1 – 5 µl ligačnej zmesi transformujeme do *E.coli* vybraného kmeňa.

(materiál : 3.2.1.)

4.8. Kultivácia tkanivových kultúr.

4.8.1. Pasážovanie myších embryonálnych fibroblastov a buniek sarkómovej línie K4

Cicavčie fibroblasty sú štandardne kultivované v termostate pri 37°C a 5% CO₂ na miskách pre tkanivové kultúry (Ø 60 mm alebo Ø 100 mm). Pasážovanie vykonávame spravidla po 3 až 4 dňoch v závislosti na konfluencii misky. Na malej miske (Ø 60 mm) kultivujeme bunky v 4-5 ml média, na veľkej miske (Ø 100 mm) v 10 ml média. Kultúru pravidelne kontrolujeme pod mikroskopom (Nikon Elipse TS 2000) aby sme včas odhalili prípadnú kontamináciu. Pred pasážovaním je treba nechať médium a trypsin vytemperovať na 37°C vo vodnom kúpeli po dobu 15 min.

- Odsajeme médium z misky. Pridáme trypsin (na malú miskú 0,5 ml, na veľkú miskú 1 ml), opláchneme celý povrch krúživým pohybom, odsajeme a nahradíme novým trypsinom s rovnakým objemom.
- Trypsin necháme pôsobiť 4-6 minút, kým sa bunky neoddelia od dna misky.
- Aktivitu trypsinu zastavíme dodaním kompletného média DMEM (na malú miskú 2ml, na veľkú miskú 5 ml) a dokonale resuspendujeme agregáty buniek.
- Na novú miskú s pripraveným kompletným médiom prenesieme požadovaný objem bunkovej suspenzie – na malú miskú 0,4 ml suspenzie do 4 ml nového

média, na veľkú miskú 1ml suspenzie do 9 ml média. V prípade transfekovaných buniek pridáme tiež selekčné antibiotikum.

4.8.2. Príprava a rozpestovanie stabilátov bunkových línií.

Príprava stabilátov

Pre prípravu stabilátov z danej bunkovej línie kultivujeme bunky na veľkých miskách až po dosiahnutie úplnej konfluencie (100%). Z jednej veľkej misky následne môžeme pripraviť dva stabiláty buniek do 1,5 ml mikroskúmaviek Nalgene.

- Z misiek odsajeme médium, opláchneme 1 ml trypsinu a opäť odsajeme
- Na miskú pridáme 1 ml nového trypsinu, prenesieme do termostatu a necháme pôsobiť po dobu 4 – 6 minút.
- Pôsobenie trypsinu zastavíme pridaním 4 ml kompletného média, resuspendujeme, prenesieme do 15 ml plastovej skúmavky Falcon a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180g, 3 min).
- Opatrne odsajeme médium, pridáme 1 ml zamrazovacieho roztoku (90% FBS, 10% dimethylsulfoxid)
- Mikroskúmavky umiestnime do zamrazovacej nádoby s isopropanolom, uložíme do -70°C a na druhý deň ich prenesieme do kontajneru s tekutým dusíkom.

Rozpestovanie buniek zo stabilátov

- Skúmavku s bunkami vyberieme z tekutého dusíku a prenášame na ľade.
- Vo vodnom kúpeli (37°C) necháme suspenziu buniek v mikroskúmavke 1-2 minúty roztopiť a prenesieme do 9 ml temperovaného kompletného média v 15 ml skúmavke Falcon.
- Suspenziu v médiu centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min) a supernatant opatrne odsajeme.
- Pridáme 5 ml nového kompletného média, resuspendujeme, prenesieme na pripravenú miskú s 5 ml média a skontrolujeme pod mikroskopom.

4.9. Transfekcia cicavčích fibroblastov

Pre transfekciu používame plazmidovú DNA prečistenú cez kolonku komerčného kitu NucleoSpin® Plasmid, ktorej koncentráciu sme predtým zmerali na spektrofotometri (Shimadzu UV 1650 PC). Pre stabilnú transfekciu si pripravíme maléisky (Ø 60 mm) s konfluenciou cca 80%. Pre tranzientnú transfekciu (bunky po 48 hodinách zlyzujeme) si pripravíme veľkéisky (Ø 100 mm). Pred transfekciou si pripravíme médium DMEM s neesenciálnymi aminokyselinami, ale bez FBS (fetálne bovinné sérum) a bez antibiotík. Pracujeme sterilne v boxe vysvietenom UV po dobu najmenej 15 minút, aby sme predišli kontaminácii.

1.deň

- Z misiek odsajeme médium a vymeníme ho za médium bez antibiotik (ATB).

2.deň

- Z misiek najprv odsajeme staré médium a pridáme médium bez FBS a ATB (na malú miskú 3 ml a na veľkú miskú 8 ml).
- V jednej mikroskúmavke resuspendujeme v 0,5 ml média bez FBS a ATB 4-15µg prečistenej plazmidovej DNA a necháme 5 minút inkubovať v boxe pri laboratórnej teplote.
- Do druhej mikroskúmavky si pripravíme 0,5 ml média bez FBS a ATB a podľa hmotnosti DNA pridáme lipofectamin – pomer môžeme zvolit : (v našich pokusoch 1 µg DNA / 3 µl lipofectamin alebo 1 µg DNA / 2 µl lipofectamin). Médium s lipofectaminom dôkladne resuspendujeme a necháme inkubovať 5 minút.
- Potom obsah oboch mikroskúmaviek spojíme, dôkladne resuspendujeme a necháme 20 minút inkubovať. Behom inkubačnej doby znovu odsajeme z misiek médium a pridáme rovnaký objem nového média opäť bez FBS a ATB .
- Po 20 minútach pridáme 1ml zmesi lipofectaminu a DNA k bunkám a necháme pôsobiť 6 h v termostate pri 37 °C.
- Po uplynutí 6 h médium odsajeme a vymeníme za médium s FBS ale bez ATB.

3 deň

- Médium z misiek odsajeme a vymeníme za kompletne médium DMEM.

4. deň

- V prípade transfekcie plazmidovou DNA, ktorá kóduje fluorescenčne značený protein, skontrolujeme fluorescenciu buniek pomocou fluorescenčného mikroskopu (Nikon Elipse TS 2000). V prípade tranzientnej transfekcie z buniek pripravíme proteinové lyzáty. V prípade stabilnej transfekcie pridáme selekčné antibiotikum, ktoré potom pridávame pri každom pasážovaní.

4.10. Príprava proteinových lyzátov z cicavčích buniek

4.10.1 Lyzáty pripravené pomocou RIPA lyzačného pufru:

Lyzáty z fibroblastov pripravujeme na ľade (prípadne v chladovej miestnosti).

- Veľkú miskú so 100% konfluentnou vrstvou buniek prenesieme z termostatu na ľad, necháme cca 5 minút ochladiť a odsajeme médium.
- Misku 2x opláchneme 5 ml vychladeným 1xPBS a odsajeme.
- Na každú miskú pridáme 1 ml premixu lyzačného pufru RIPA a inhibitorov. Necháme lyzovať 12-15 minút pri 0 °C na preklápacej trepačke (Biosan, MR-1).
- Bunky z povrchu misky zoškrabeme škrabkou, prevedieme do mikroskúmavky a pretiahneme 6-12x injekčnou striekačkou s ihlou 21G pokiaľ nieje suspenzia číra a bez bunkových agregátov.
- Suspenziu centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417R, 11000g, 20 min, 0°C).
- Po centrifugácii odsajeme opatrne supernatant, prevedieme do novej mikroskúmavky a odoberieme aliquot 50 µl pre stanovenie proteinovej koncentrácie. Lyzáty necháme zamraziť v -20°C.

(*materiál* : 3.3.)

4.10.2. Lyzáty pripravené pomocou Leammli lyzačného pufru

- 2x Leammli lyzačný pufr si necháme vyhriať na 75°C.
- Veľkú miskú so 100% konfluentnou vrstvou buniek prenesieme z termostatu na ľad a necháme vychladiť cca 5 minút a následne odsajeme médium
- Misku následne 2 x 5 ml opláchneme ľadovým PBS a odsajeme.

- Pridáme vyhriaty 2x Leammli lyzačný pufr a ihneď zoškrabeme do mikroskúmavky.
- Potom mikroskúmavky s lyzačnou zmesou povaríme 15 minút pri 100°C. Lyzáty uchováame v -20°C.

(materiál : 3.3.)

4.11. Stanovenie koncentrácie proteínov – Folinova metóda

Koncentrácia proteínov vo vzorkách z cicavčích fibroblastov bola stanovená kolorimetricky pomocou úpravy D_c Protein Assay (Bio-Rad, USA)

- Pripravíme si riediacu radu hovädzieho sérového albumínu (BSA) nasledujúcim spôsobom:

BSA 2mg/ml (μl)	Pufr RIPA (μl)	Výsledná koncentrácia BSA (μg/μl)
0	50	0
5	45	200
10	40	400
20	30	800
37,5	12,5	1500

- Z odobraného 50 μl aliquotu lyzátu prenesieme 25 μl do novej mikroskúmavky a zmiešame s 25 μl pufru RIPA.
- Pridaním 20 μl roztoku S do 1 ml roztoku A si pripravíme roztok A'. Do mikroskúmviek potom pipetujeme 125 μl A' a 25 μl lyzátu riedeného pufrom RIPA alebo štandardu BSA.
- Do každej mikroskúmavky potom dodáme 1 ml roztoku B, krátko zamiešame na vortexe a necháme 15 minút v tme.
- Po 15-tich minútach zmeriame na spektrofotometri absorbanciu vzoriek pri 750 nm (takto pripravené vzorky sú stabilné 2 h)

Z nameraných dát štandardov so známou koncentráciou vytvoríme graf závislosti absorbancie na koncentrácii. Dopočítame koncentráciu proteínov v našich lyzátoch a upravíme koncentráciu vo všetkých vzorkách na rovnakú hladinu pomocou riedenia

pufrom RIPA a potom doplníme $\frac{1}{4}$ objemu Leammli pufrom (6x koncentrovaný). K takto upraveným lyzátom pridáme $\frac{1}{20}$ objemu 1 M DTT, 5 minút povaríme v bločku pri 100°C a nanášame na gél pre SDS – PAGE.

4.12. Tris – glycinová SDS – gélová elektroforéza proteínov (SDS-PAGE) s využitím súpravy BIO-RAD Mini Protean III Cell

Po zostavení aparatury pre nalievanie gélov namiešame zmes pre separačný gél a ihneď aplikujeme do priestoru medzi sklá v aparátúre a prekryjeme vrstvou miliporovej vody. Po stuhnutí gélu (10-30 min) vodu odsajeme a nahradíme čerstvo namiešanou zmesou pre zaostrovací gél. Medzi sklá vložíme hrebeň na vytvorenie jamiek pre nanášanie vzoriek. Po polymerácii zaostrovacieho gélu jamky niekoľkokrát prepláchneme pufrom pre SDS-PAGE.

Roztoky proteínov vo vzorkovom pufre doplníme $\frac{1}{20}$ objemu 1 M dithiotreitolu (DTT), inkubujeme 3 minúty pri 100°C a po odstránení prípadných pevných účastí centrifugáciou (10000g, 0,5 min) nanesieme do jamiek v gély. Dvojicu gélov (alebo jeden gél s doplňujúcim nástavcom) vložíme do aparatury pre elektroforézu a zalejeme pufrom pre SDS-PAGE.

Pokiaľ sa bromfenolová modrá z vzorkového pufru (a spolu s ňou tzv. čelo elektroforézy) pohybuje v zaostrovacom géle, prebieha elektroforetické delenie pri konštantnom prúde 10mA/gél. Po vyputovaní čela elektroforézy zo zaostrovacieho gélu nastavíme pretekajúci prúd na 20 mA/gél. Keď čelo elektroforézy dosiahne spodný okraj gélu, odpojíme zdroj elektrického napätia a gél vyberieme z aparatury. Následne môžeme gél ofarbiť pomocou Commasie brilliant blue alebo použiť pre prenos proteínov na membránu metódou Western blot.

(*materiál : 3.4.*)

Gélovú zmes pre 2 gély široké 0,75 mm zmiešame v nasledujúcom poradí:	
10% separačný gél:	Zaostrovaný gél:
3,33 ml protogel	0,65 ml protogel
2,5 ml 4xTris/SDS pH 8,8	1,25 ml 4x Tris/SDS pH 6,8
4,17 ml voda	3,1 ml voda
12 µl TEMED	10µl TEMED
60 µl 10% APS	50µl 10% APS

4.13. Western blot (prenos proteínov na membránu pomocou BIO-RAD Trans-blot)

Gél s proteínami rozdelenými pomocou SDS-PAGE preniesieme na filtračný papier Whatman navlhčený v blotovacom pufrí a zostavíme aparáturu pre prenos na nitrocelulóзовú membránu (Nitrobind, MSI, USA) v nasledujúcom poradí: izolačná hubka, filtračný papier Whatman, gél, membrána (navlhčená v blotovacom pufrí), filtračný papier Whatman, izolačná hubka.

Prenos necháme prebiehať pri napätí 100V (240mA) za stáleho miešania a chladenia ľadom po dobu 1,5 hodiny. Membránu s prenesenými proteínami opláchneme v TBS a následne môžeme pokračovať v postupe pre imunodetekciu proteínov alebo membránu zatavíme do polyetylénovej fólie pre pozdejšie spracovanie. Gél po blotovaní môžeme pre kontrolu prenosu proteínov ofarbit cca 30 min vo farbiacom roztoku a potom nechať odfarbovať do druhého dňa.

(*materiál* : 3.4.)

4.14. Imunodetekcia proteínov na membráne

Membránu s prenesenými proteínami opláchneme roztokom TBS a blokujeme 45-60 minút vo zvolenom blokovacom roztoku na preklápacej trepačke (Biosan, MR-1). Zablockovanú membránu zatavíme do polyetylénovej fólie a inkubujeme s roztokom primárnej protilátky cez noc (cca 16-18 h) na preklápacej trepačke v chladničke pri

4°C. Nadbytočnú primárnu protilátku potom odstránime odmytím v TTBS (3x10 minút).

Roztok sekundárnem protilátky konjugovanej s chrenovou peroxidázou pridáme k membráne zatavenej do polyetylénovej fólie a inkubujeme pri laboratórnej teplote 1 h. Potom membránu odmyvame 3 x 10 min v TTBS a 1x10 min v TBS v dostatočne veľkom objeme roztoku.

Po odmytí nadbytočnej sekundárnej protilátky membránu inkubujeme s vyvíjacím roztokom pre chrenovú peroxidázu (HRP).

Membránu vo vyvíjacom roztoku pre chrenovú peroxidázu inkubujeme cca 5 min. na tmavom mieste. Membránu po inkubácii krátko osušíme a vložíme do priehľadnej kancelárskej fólie. Následne membránu vyvolávame pomocou vyvolávacieho prístroja LAS 4000 (FUJI).

SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce Biotechnology) súprava obsahuje roztoky:

Roztok luminolu s enhancerom

Roztok stabilného peroxidu

Vyvíjecí roztok pre chrenovú peroxidázu pripravíme zmiešaním roztokov z príslušnej súpravy v pomere 1:1.

4.15. Imunohistochemické farbenie cicavčích buniek

Bunky pre imunohistochemické farbenie necháme rásť minimálne 24 hodín na sklíčkách. Sklíčka sa omývajú v HCl pre zdrsnenie povrchu, následne sa omývajú vo vode a uchovávajú sa v čistom etanole. Pred použitím sa sklíčka z etanolu vytiahnu a opália. Následne slička vložíme do 6-jamkovej dosičky. V prípade potreby môžeme pokryť proteínami extracelulárnej matrix. Nakoniec na sklíčka nanesieme bunkovú suspenziu v kompletnom médiu a necháme rásť v termostate pri 37°C.

- Po vybratí sklíčiek s bunkami z termostatu ich 2x opláchneme v 1xPBS a fixujeme v 4% paraformaldehyde po dobu 10 minút.
- Po fixácii bunky 2 x opláchneme v 1xPBS

- Následne na bunky aplikujeme roztok 0,3% Triton-X100 v Mg-PBS (permeabilizácia bunkových membrán) po dobu 10 minút a následne opäť 2 x opláchneme v 1xPBS.
- Sklíčka prenesieme z 6 jamkovej kultivačnej dosičky na parafilm (bunkami navrch) a blokujeme 30 minút v 200 µl 3% BSA v Mg-PBS.
- Po zablokovaní položíme sklíčka bunkami dole na 50 µl kvapku premixu primárnej protilátky a inkubujeme 2-3 hodiny.
- Po uplynutí danej doby sklíčka dáme späť do 6 jamkovej kultivačnej dosičky a 3-4 x odmyjeme v 1x PBS po dobu 30 minút.
- Následne sklíčka prenesieme opäť na parafilm bunkami hore a kvapneme na ne 100µl premixu sekundárnej protilátky a inkubujeme 1 hodinu.
- Po inkubácii sklíčka opäť prepláchneme 3-4 krát v 1x PBS po dobu 30 minút.
- V prípade farbenia buniek faloidínom konjugovaným s fluorescenčnými značkami sklíčka opäť dáme na parafilm a kvapneme na ne 70µl roztoku, v ktorom sa nachádza 1 µl faloidínu. Inkubujeme 10 minút a následne odmyvame v 1x PBS rovnakým spôsobom ako po primárnej aj sekundárnej protilátke.
- Sklíčka prepláchneme v destilovanej vode aby sme odmyli prebytočné soli, postavíme sklíčko na buničinu a väčšinu vody odsajeme. Na podložné sklíčko nanesieme 7 µl montovacieho média s DABCO a prikryjeme sklíčkom s bunkami.

(materiál . 3.6.)

4.16. Pokrývanie sklíčok proteínmi extracelulárnej matrix

4.16.1. Príprava sklíčok pokrytých želatinom konjugovaným s fluorescenčnou značkou AlexaFluor633

- Na začiatok rozpustíme 10 mg želatínu v 1 ml 0,1 M hydrogenuhličitanu sodného.
- Následne rozpustíme fluorescenčnú značku AlexaFluor 633 (1 mg) v 100 µl dimethyl formamide a pridáme po kvapkách k roztoku želatínu a zamiešame

(30 minút, 4°C, chladová miestnosť) – 2 µl roztoku AlexaFluor633 do 1 ml roztoku želatínu.

- Konjugovaný želatin-alexafluor633 oddelíme od neskonjugovanej fluorescenčnej značky premytím cez kolonu.
- Následne vytvoríme premix vody a roztoku želatin-alexafluor633 (5 µl želatin-alexafluor633 a 45 µl vody). Touto zmesou pokryjeme sklíčko a necháme cca hodinu schnúť pri laboratórnej teplote.
- Po zaschnutí pridáme 300 µl H₂O a dáme na 15 minút do chladničky.
- Potom pridáme 2 ml 0,5 % roztoku glutaraldehydu v PBS a opäť vložíme do chladničky na 30 minút.
- Po inkubácii opláchneme 2 x sterilným PBS a necháme 24 hodín v chladničke v PBS.
- Pred pridaním buniek k takto pripraveným sklíčkam ich ešte 1x opláchneme v kompletnom DMEM médiu.

4.16.2. Príprava sklíčok pokrytých fibronektínom

- Pripravíme si roztok fibronektínu 10 µg/ml vo vode (zásobní roztok 1 mg/ml).
- Následne týmto roztokom pokryjeme sklíčka (100µl na sklíčko)
- Necháme v sterilnom boxe schnúť cca 2 hodiny.
- Po uschnutí na sklíčka priamo aplikujeme bunkovú suspenziu.

4.17. Želatínová zymografia

- Bunky na kofluentných veľkých miskách trypsinizujeme ako pri pasážovaní. Aktivitu trypsinu inhibujeme 4 ml kompletného média. Bunkovú suspenziu preniesieme do 15 ml plastovej skúmavky Falcon a centrifugujeme.
- Supernatant opatrne odsajeme a bunkový sediment resuspendujeme v 10 ml média s FBS a centrifugujeme
- Predchádzajúci krok zopakujeme ešte raz.
- Spočítame bunky a pripravíme si koncentrácie 50 000, 100 000 a 200 000 buniek v 500 µl média s FBS

- Bunkovú suspenziu s danou koncentráciou premiestnime na 24 jamkovú dosičku v duplikátoch.
- Ďalší deň 2 x opláchneme bunky médiom bez FBS. Následne k bunkám pridáme 300 µl média bez FBS.
- Po 24 hodinách odoberieme vzorku 30 µl z každej jamky a zamrazíme v -70°C.
- Po 72 hodinách odoberieme vzorku 30 µl z každej jamky a zamrazíme v -70°C.
- Vzorky pre zymografiu pripravíme zmiešaním 23 µl odobraného supernatantu s 7 µl 4x Laemmli pufru. K vzorkom nepridávame DTT ani ich nevaríme.
- Pripravíme 10% gél pre SDS-PAGE ako obvykle. Namiesto vody však pridáme želatin ako substrát v koncentrácii 5 mg/ml.
- Do každej jamky nanesieme 30 µl vzorky.
- Gél pustíme pri 4 °C (aparatúru umiestnime do chladničky alebo obklopíme ľadom) pri napätí 15 mA.
- Po skončení SDS-PAGE renaturujeme proteiny inkubáciou gélu v renaturačnom pufre po dobu 2 hodín. Po hodine inkubácie pufr vymeníme za nový.
- Gél opláchneme vodou a inkubujeme cez noc v aktivačnom pufre v termostate pri 37°C.
- Po skončení inkubácie gél ofarbíme Coomassie Blue 30 minút pri laboratórnej teplote.
- Polohu skúmaných degradačných enzýmov určíme podľa neofarbených miest v géle.

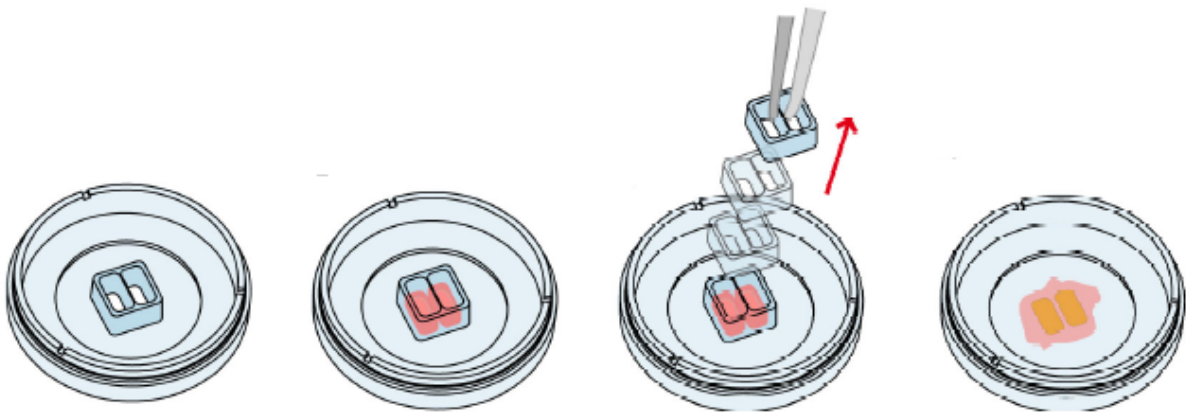
(materiál : 3.5.)

4.18. Migračné eseje

4.18.1. IBIDI systém pre sledovanie bunkovej migrácie.

- Narastené bunky trypsinizujeme, spočítame a pripravíme si suspenziu s koncentráciou $7 \cdot 10^5$ buniek na ml.
- Do IBIDI inzertov aplikujeme 70 µl pripravenej bunkovej suspenzie.

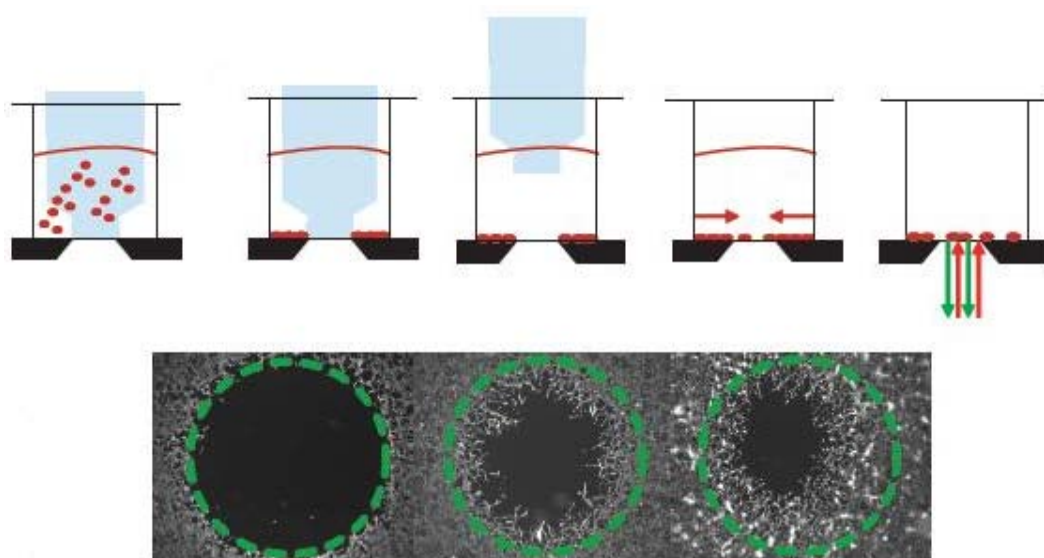
- Potom bunky vložíme do inkubátora (37 °C, 5 % CO₂) a necháme ich tam do druhého dňa.
- Na druhý deň IBIDI inzerty vytiahneme pomocou sterilnej pinzety. Vytvoríme tak priestor, do ktorého budú bunky migrovať.
- Proces zarastania voľného priestoru sledujeme a toto postupné zamigrovávanie vytvoreného voľného priestoru fotodokumentujeme pomocou mikroskopu Nikon-Eclipse TE2000-S (10x/0.25 Plan Fluor objektive) každé 3 hodiny.



Obr. 4.1. Schematický postup IBIDI migračnej eseje.

4.18.2. Platypus (Oris) systém pre sledovanie bunkovej migrácie.

- Bunkovú suspenziu si pripravíme tak ako v predchádzajúcom prípade ale koncentráciu buniek volíme 50 000 buniek na 100 µl.
- Do 96 jamkovej dosičky vložíme tzv. stopre, ktoré vytvoria na dne každej jamky priestor, do ktorého budú bunky následne migrovať.
- Následne do jamiek aplikujeme 100 µl bunkovej suspenzie, vložíme do inkubátora (37°C, 5 % CO₂) a necháme bunky cez noc prisadnúť.
- Na druhý deň stopre vytiahneme a necháme bunky migrovať do stredu jamiek. Proces zamigrovávania tejto plochy fotodokumentujeme každé 3 hodiny pomocou mikroskopu Nikon-Eclipse TE2000-S (4x/0.13 Plan Fluor objectives).

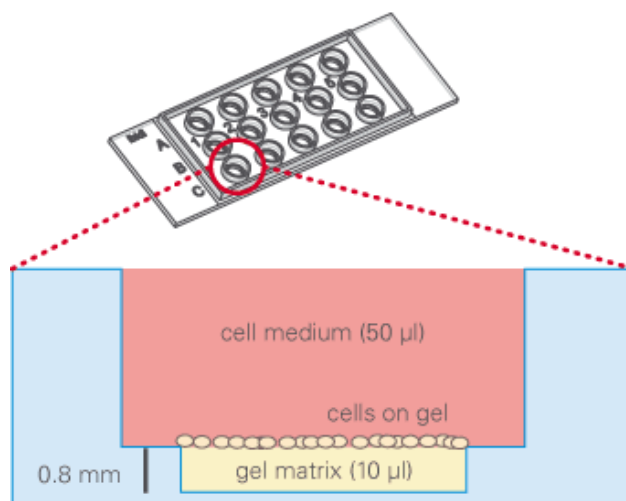


Obr. 4.2. Schematický postup Platypus (Oris) migračnej eseje.

4.19. Test invazivity

Na testovanie invazívnych schopností buniek sme použili *μ-Slide Angiogenesis* systém od firmy *IBIDI*.

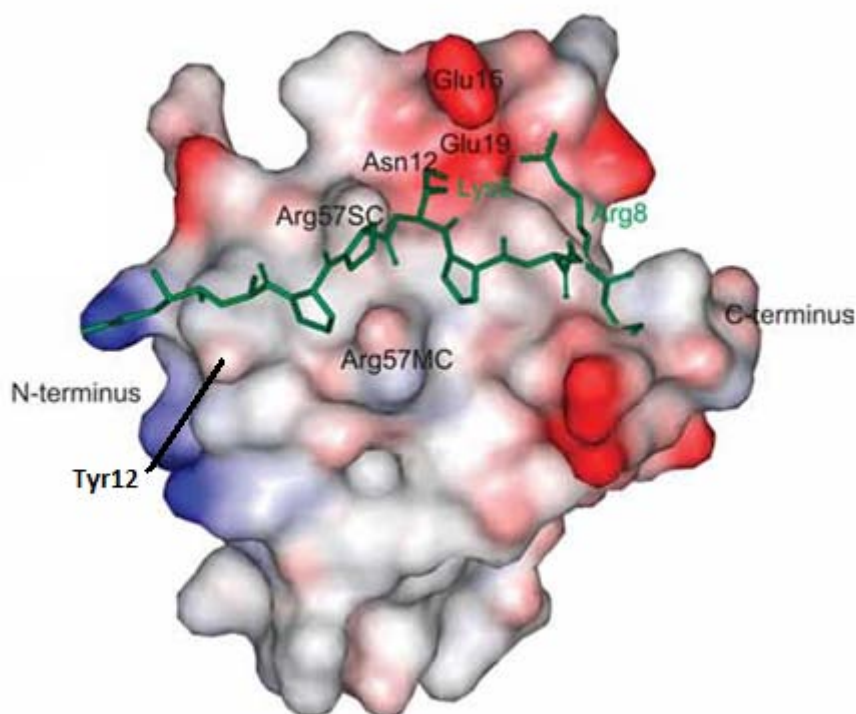
- V prvom kroku si pripravíme roztok kolagénu nasledujúcim spôsobom :
 200 μl collagen G (4mg/ml) Biochrom
 200 μl collagen R (2mg/ml) Serva
 46 μl NaHCO_3
 46 μl média HMEM
- 10 μl tohto roztoku aplikujeme do každej jamky v *μ-Slide Angiogenesis* dosičke.
- Vložíme do inkubátoru (37°C) a počkáme cca 30 minút kým roztok kolagénu neztuhne.
- Následne si pripravíme bunkovú suspenziu s koncentráciou $2 \cdot 10^5$ buniek/ml. 50 μl tejto supenzie potom aplikujeme do každej jamky na stuhnutý kolagén.
- Vložíme do inkubátoru (37°C, 5 % CO_2) a po troch dňoch vyhodnotíme počet buniek, ktoré invadovali a tiež hĺbku do akej sa dostali.



Obr. 4.3. Schématický postup testovania invazivity pomocou μ -Slide Angiogenesis systému.

5.Výsledky:

Cieľom tejto práce je objasniť vplyv fosforylácie tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS na väzbu prirodzených ligandov SH3 domény a s tým spojenú reguláciu bunkových odpovedí sprostredkovaných cez proteín CAS. Tyrozín 12 sa nachádza na väzbovom povrchu SH3 domény a je jednou z aminokyselín, ktoré tvoria prvú hydrofóbnu väzbovú kapsu, pre väzbu polyprolínového helixu.



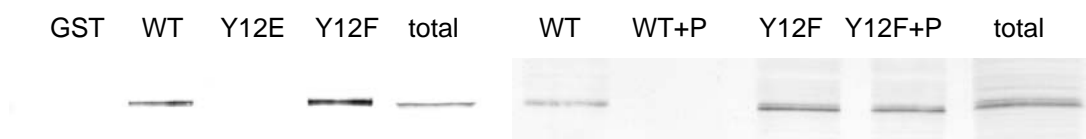
Obr. 5.1. Väzbový povrch SH3 domény proteínu CAS zobrazený s naviazaným FAK peptidom (zelene). Povrch SH3 domény zobrazený v rôznych farbách v závislosti na náboji (biele plochy – neutrálne aminokyseliny, červené plochy – negatívne nabité aminokyseliny, modré plochy – pozitívne nabité aminokyseliny.

(prevzaté a upravené podľa (Wisniewska *et al.*, 2005))

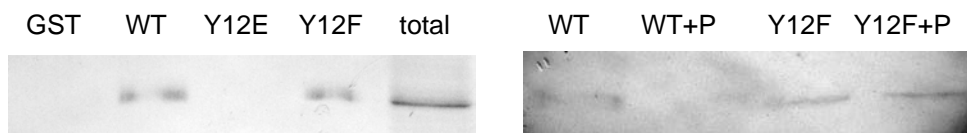
Tyrozín 12 ako miesto fosforylácie v SH3 doméne proteínu CAS bolo objavené pomocou fosfoproteomickej štúdie urobenej v spolupracujúcom laboratóriu profesora Hanksa (Vanderbilt University, USA) (Luo W. *et al.*, *J Proteome Res.* 2008). Pre analýzu významu fosforylácie tyrozínu 12 v SH3 doméne CAS bolo

potrebné vymeniť tyrozín 12 za aminokyseliny, tak aby vznikla varianta napodobujúca fosforylovaný stav alebo naopak aby bola nefosforylovateľná. Najvhodnejšími kandidátmi boli aminokyseliny glutamát ako fosfomimikujúca mutácia (Y12E), ktorý má vo svojom postrannom reťazci skupinu so záporným nábojom, napodobujúcim záporný náboj fosfátovej skupiny a fenylalanín ako nefosforylovateľná varianta, keďže sa od tyrozínu líši iba tým, že neobsahuje OH skupinu na benzénovom jadre. Takto pripravené varianty následne použil môj školiťel dr. Brábek a pomocou GST-pull down experimentu s GST-značenou SH3 doménou CAS dokázal, že výmena tyrozínu 12 za fosfomimikujúci glutamát (Y12E) zrušila väzbu SH3 domény s kinázou FAK a fosfatázou PTP-PEST. Taktiež *in vitro* fosforylovacia wt-SH3 domény CAS spôsobila zrušenie väzby s rovnakými ligandami. Na druhej strane výmena tyrozínu 12 za fenylalanín (Y12F) nemala žiadny efekt na interakciu (obr. 5.2.)

FAK

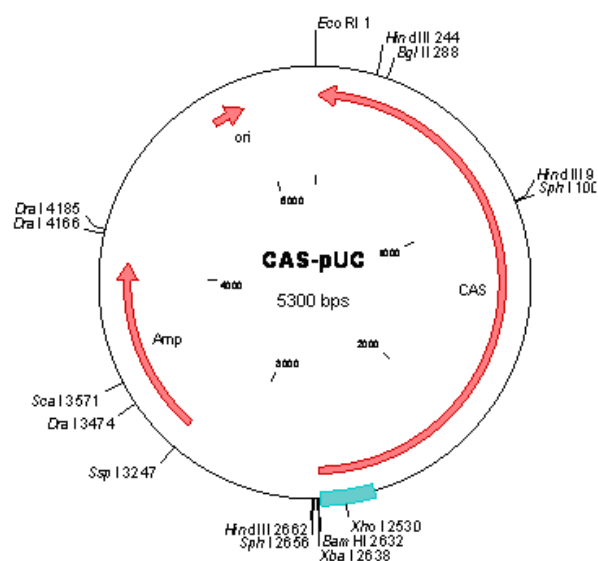
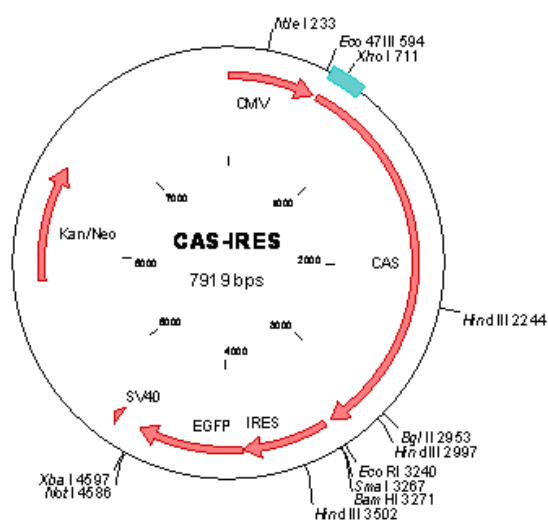


PTP-PEST



Obr. 5.2. Interakcia GST značených SH3 domén s prirodzenými ligandami – kinázou FAK (hore) a proteín fosfatázou PTP-PEST (dole). Fosfomimikujúca mutácia Y12E a taktiež fosforylacia tyrozínu 12 spôsobuje zrušenie väzby jednak s FAK i PTP-PEST pričom Y12F mutácia nemá žiadny efekt.

Pre analýzu efektu fosforylácie tyrozínu 12 na rôzne bunkové odpovede bolo potrebné vytvoriť varianty proteínu CAS mutované v SH3 doméne v rámci celého proteínu. Pripravené varianty proteínu CAS s výmeneným Y12 za fenylalanín alebo glutamát boli následne vložené do vektorov a vytvorené vektory CAS-pUC a CAS-IRES-GFP (obr.5.3 A, B).

A**B**

Obr. 5.3. A. Vektor pUC s vloženým CAS fragmentom. B. Vektor IRES-GFP s vloženým CAS fragmentom.

5.1. Exogénna expresia proteínu CAS v cicavčích bunkách.

5.1.1. Príprava expresných vektorov s vloženým fragmentom DNA kódujúcim proteín CAS.

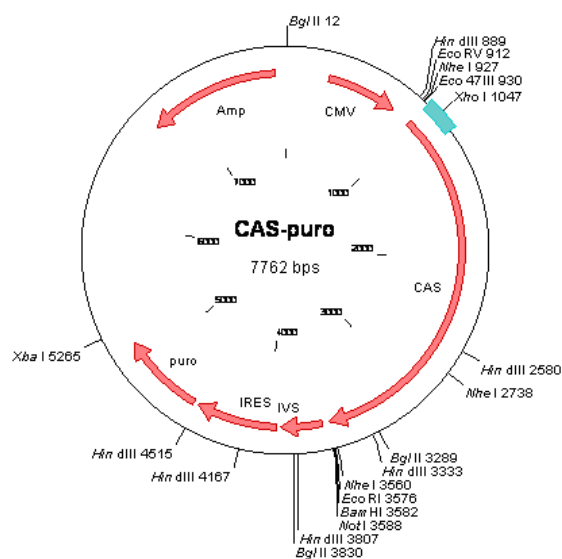
Pre prípravu expresných vektorov bola využitá DNA kódujúca proteín CAS, ktorá bola predtým vložená do vyššie uvedených vektorov. Následne boli fragmenty DNA vložené do vektoru pIRES-puro, ktorý bol použitý pri príprave stabilne transfekovaných línií. Ďalším použitým vektorom bol pEGFP-C1, pomocou ktorého sme získali proteín CAS fúzovaný s GFP na N-konci. Tento vektor bol využitý na tranzientnú transfekciu.

Pri príprave pIRES-puro vektoru pre tvorbu stabilných línií bol východným vektorom CAS-IRES-GFP vektor. Pomocou restričných endonukleáz Eco47III a EcoRI bol CAS fragment vyštepovaný z vektoru. Restričná zmes bola následne rozdelená pomocou agarozovej elektroforézy a fragment odpovedajúcej veľkosti bol z gelu vyizolovaný. Fragment bol zmiešaný s pripraveným vektorom pIRES-puro v pomere 3:1 a ligovaný do vektoru. Po overení úspešnosti ligácie pomocou

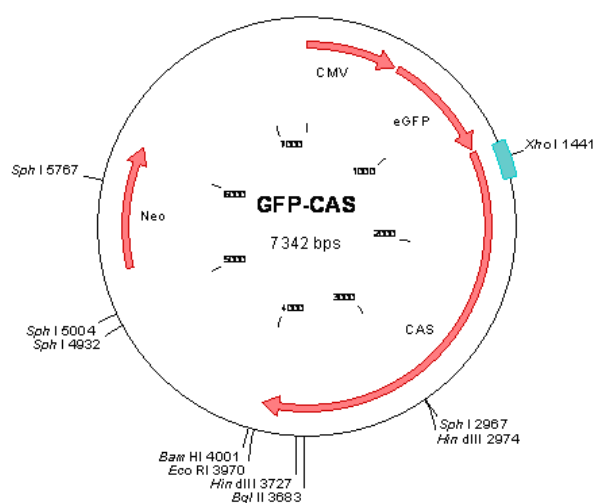
agarózovej elektroforézy, bol vektor transfekovaný elektroporetickou metódou do kmeňa *E.coli*, naprodukovaný vo veľkom a následne vyizolovaný a pripravený na tranfekciu do cicavčích buniek.

V druhom prípade bol východzí vektorom CAS-pUC. V tomto prípade boli na vyštiepenie fragmentu použité restriktčné enzýmy *EcoRI* a *BamHI*. Ďalší postup bol analogický s prípravou vektoru pIRES-puro (viď vyššie).

A



B



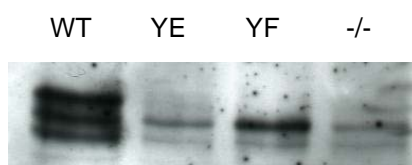
Obr. 5.4. A. Vektor pIRES-puro-CAS určený pre prípravu stabilných transfekcií. B. Vektor CAS-EGFP-C1 určený pre prípravu tranzientných transfekcií.

5.1.2. Príprava línii myších embryonálnych fibroblastov exprimujúcich varianty proteínu CAS.

Pre prípravu stabilne transfekovaných línii myších embryonálnych fibroblastov (MEF) bol použitý vektor pIRES-puro-CAS, ktorý niesol gén pre rezistenciu k selekčnému antibiotiku puromycín. MEF, ktoré neexprimovali proteín CAS (CAS^{-/-} MEF) boli transfekované pomocou reagentu Lipofectamine 2000 a na tretí deň po transfekcii sa začalo s pridávaním puromycínu v koncentrácii 3 µg/ml. Po kultivácii a selekcii trvajúcej 5 týždňov, keď boli bunky rozrastené na dostatočné množstvo,

boli vytvorené stabiláty pre ďalšie použitie a úspešnosť transfekcie bola overená pomocou western blotu (obr. 5.5. A, B). Z priloženej vyvolanej membrány sme usúdili, transfekcia bola úspešná avšak hladina expresie CAS u MEF sa u jednotlivých variant líšila, na rozdiel od hladiny expresie CAS v Src-transformovaných MEF, kde bola na rovnakej úrovni.

A. p130Cas (MEF)



B. p130Cas (MEF+SrcF)



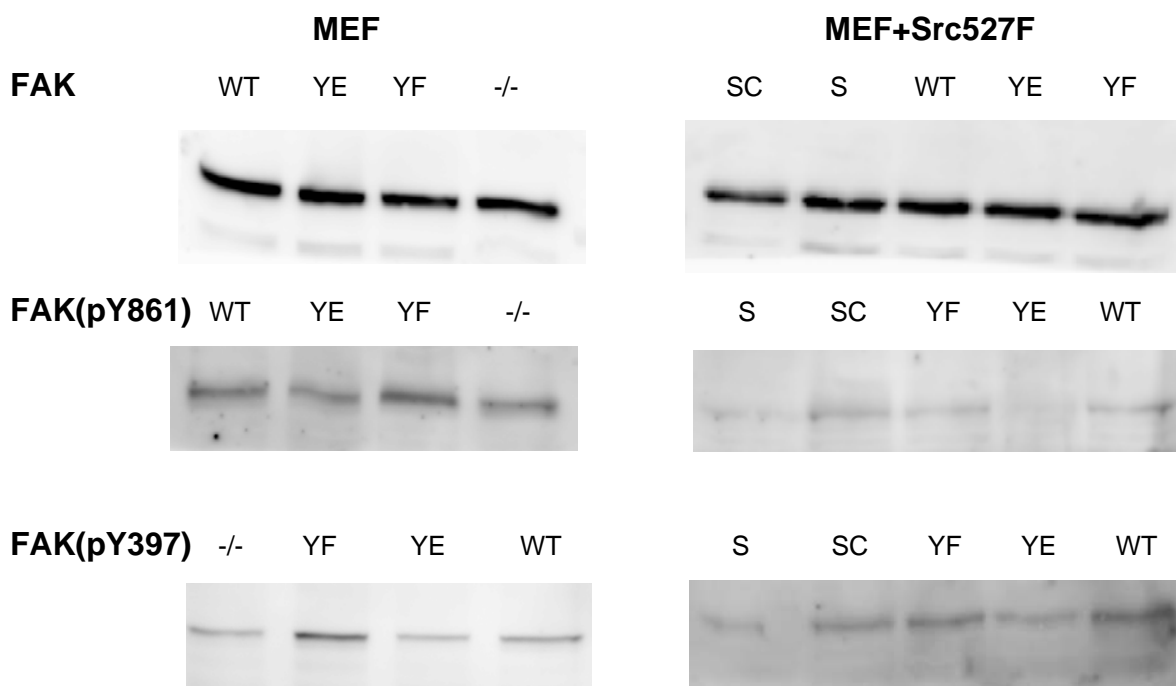
Obr. 5.5. A. Hladina expresie proteínu CAS v myších embryonálnych fibroblastoch (WT – nemutovaný CAS, YE – tyrozín 12 v SH3 doméne mutovaný za glutamát, YF - tyrozín 12 v SH3 doméne mutovaný za fenylalanín). **B Hladina expresie proteínu CAS v myších embryonálnych fibroblastoch transformovaných aktivovanou variantou kinázy Src** (Src527F – tyrozín 527 mutovaný za fenylalanín, WT – nemutovaný CAS, YE – tyrozín 12 v SH3 doméne mutovaný za glutamát, YF - tyrozín 12 v SH3 doméne mutovaný za fenylalanín, SC – pozitívna kontrola MEF+Src527F kde je protein CAS expimovaný pomocou retrovirového transferu)

5.2. Efekt exogénnej expresie proteínu CAS na celkové množstvo fosforylácie proteínov.

Fosforylácia proteínov komplexu fokálnych adhézii je dôležitým krokom v prenose signálu od integrínových receptorov na povrchu ďalej do bunky. Protein CAS je dôležitým adaptorovým proteínom vo fokálnych adhéziách a interaguje s roznyimi proteínmi fokálnych komplexov a má tak výrazný vplyv na fosforyláciu tyrozínov v ich reťazcoch.

Jedným takýmto proteínom je aj kináza FAK (125kDa), ktorá má niekoľko tyrozínov v reťazci, ktoré môžu podliehať fosforylácii. Z predchádzajúcich

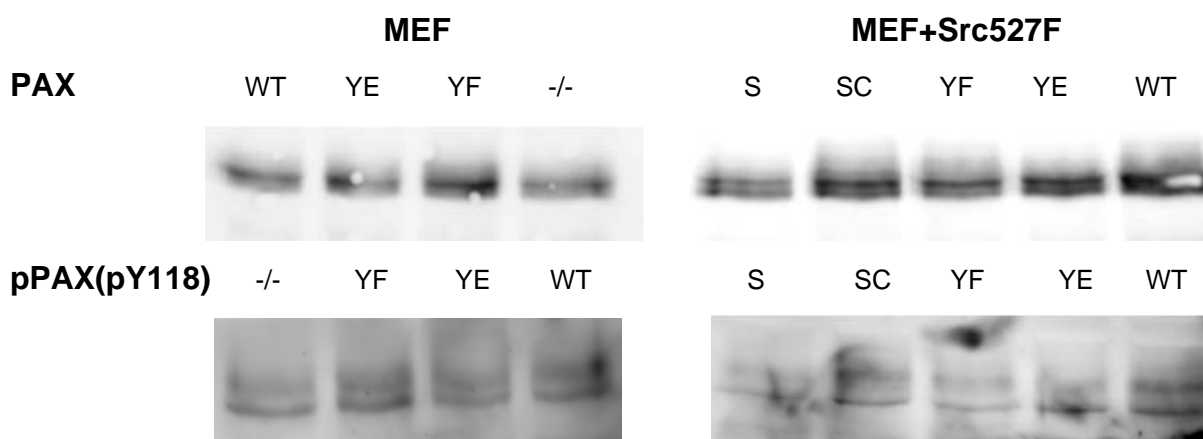
experimentov vyplýva, že expresia CAS v myších embryonálnych fibroblastoch jednak netransformovaných i transformovaných mierne zvyšuje fosforyláciu tyrozínu 397 (FAK autofosforylačné miesto) a výrazne zvyšuje fosforyláciu tyrozínu 861 (tyrozín fosforylovaný kinázou Src) (*Brábek et al., 2004*). Z tohoto dôvodu sme analyzovali fosforyláciu týchto tyrozínov i u variant CAS s mutovanou SH3 doménou. Proteínové lyzáty z MEF expimujúcich varianty CAS boli zrovnané na rovnakú koncentráciu a boli z nich pripravené vzorky na SDS-PAGE (lyzát+DTT+6xLaemmli). Následne boli vzorky rozdelené na 10% polyakrylamidovom géle, prenesené na nitrocelulózovú membránu metódou western blot. Membrána bola potom zablokovaná v BSA a inkubovaná v primárnej a následne sekundárnej protilátke konjugovanej s chrenovou peroxidázou. Z vyvolaných membrán vyplýva, že mutácia Y12E znižovala mieru fosforylácie tyrozínov 397 a 861 kinázy FAK na úroveň MEF s deletovaným proteínom CAS. Na druhej strane miera fosforylácie Y397 a Y861 kinázy FAK bola v MEF reexprimujúcich nemutovanú formu CAS i mutáciu Y12F rovnaká ako v kontrolných lyzátoch z SC buniek (Src527F transformované MEF reexprimujúce CAS z retrovirového vektoru) (obr.5.6.)



Obr. 5.6. Množstvo fosforylácie tyrozínov 397 a 861 v reťazci kinázy FAK. Glutamátová mutácia (Y12E) znižuje fosforyláciu tyrozínov 397 a 861 oproti nemutovanej forme i Y12F mutácii. U netransformovaných fibroblastov je toto zníženie menej výrazné ako u transformovaných (SC – pozitívna kontrola MEF+Src527F kde je proteín CAS expimovaný pomocou retrovirového transferu, S

– negatívna kontrola, MEF + Src527F s deletovaným génom pre CAS). Vzorky sú normalizované na rovnaké množstvo proteínu.

Ďalším proteínom, ktorý sa vyskytuje vo fokálnych adhéziách a je zapojený do dráhy integrínovej signalizácie je paxilin (68kDa). Tento adaptorový proteín je tiež fosforylovaný na tyrozínoch v závislosti na integrínovej signalizácii a taktiež na jeho fosforylačný status vplýva prítomnosť či neprítomnosť p130Cas (*Brabek et al., 2004*). Vychádzajúc z tohoto sme analyzovali i tyrozínovú fosforyláciu paxilínu – tyrozín 118. Avšak pri analýze western blotom sme nezistili žiadne signifikantné rozdiely vo fosforylácii tyr118 v líniiach exprimujúcich fosfomimikujúcu variantu p130Cas (Y12E) ani nefosforylovateľnú formu (Y12F) (obr. 5.7.)



Obr. 5.7. Fosforylácia paxilínu na tyrozíne 118. Množstvo fosforylovaného tyrozínu 118 je v líniiach exprimujúcich protein CAS (expresia z puromycínového vektoru (WT,YE, YF) i z retrovirového transferu (SC)) je zrovnateľné pričom sa odlišuje len od S buniek (Src527F transformované CAS deficientné fibroblasty), kde je fosforylácia Tyr118 znížená.

Keďže interakcia kinázy FAK s SH3 doménou proteínu CAS je dôležitá pre fosforyláciu substrátovej domény, ďalším krokom bola analýza vplyvu mutácií v SH3 doméne (Y12E, Y12F) na túto fosforyláciu. Opäť pomocou western blotu sme zistili, že ak bol tyrozín 12 v SH3 doméne CAS vymenený za fenylalanín (nefosforylovateľná forma) a takto mutovaný CAS bol exprimovaný v Src527F transformovaných MEF, fosforylácia tyrozínu 410 v substrátovej doméne bola zvýšená (obr 5.8.).



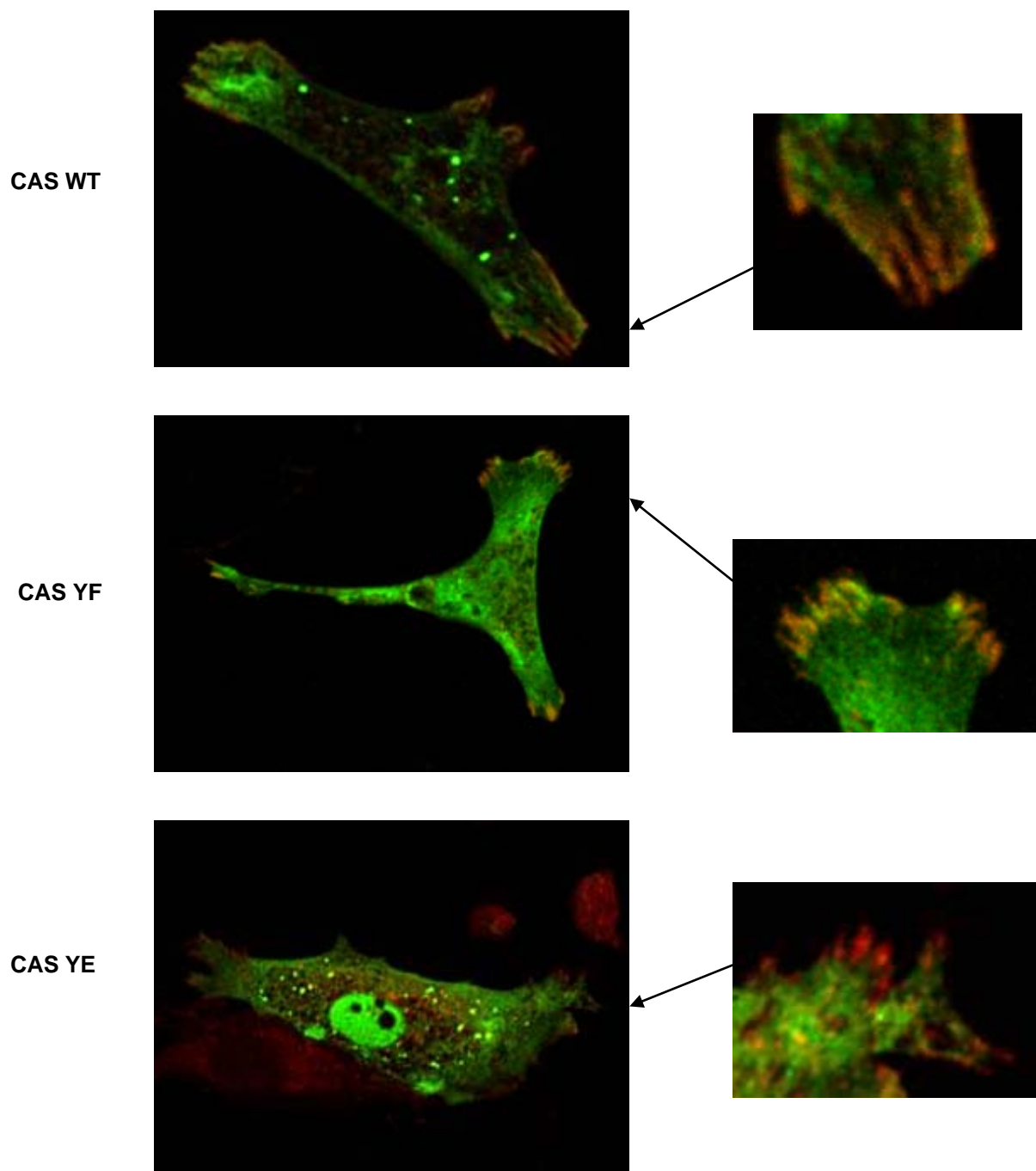
Obr. 5.8. Fosforylácia tyrozínu 410 v substrátovej doméne p130Cas. Mutácia Y12F zvyšuje tyrozínovú fosforyláciu substrátovej domény nad úroveň fosforylácie v Y12E mutantovi i u wild-type CAS. Lyzát z SC buniek je prítomný ako pozitívna kontrola veľkosti a je 10x podriadený z dôvodu vysokej expresie p130Cas z retrovirového transferu nad úroveň mnou pripravených puromycínových línií. Lyzáty z puromycínových línií boli upravené na rovnaké množstvo proteínu CAS.

5.3. Vplyv mutácie tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS na jeho lokalizáciu.

SH3 doména proteínu CAS je dôležitá pre jeho lokalizáciu do fokálnych adhézii (*Nakamoto et al., 1997*) a preto sme sa rozhodli zistiť ako vplýva mutovanie Tyr12 na jeho lokalizáciu.

5.3.1. Vplyv Y12E mutácie na lokalizáciu CAS v myších embryonálnych fibroblastoch.

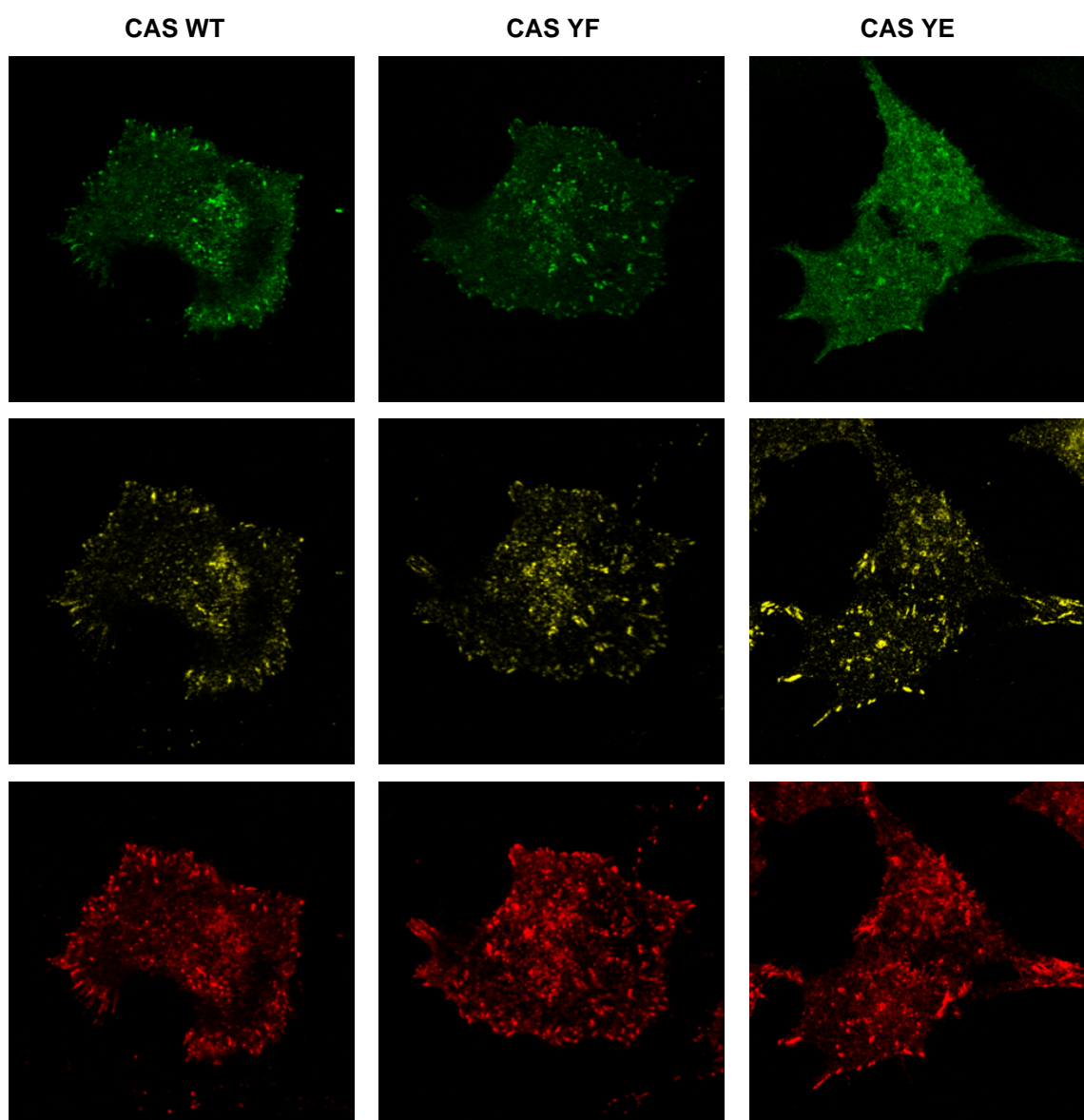
Prvým modelom pre zisťovanie lokalizáciu mutovaného proteínu CAS boli netransformované myšie embryonálne fibroblasty. MEF boli transfekované GFP značeným CAS. Na tretí deň po transfekcii boli prenesené na krycie sklíčka pokryté fibronektínom. Po 24 hodinách boli sklíčka niekoľkokrát opláchnuté v PBS, zafixované a inkubované s protilátkou proti fosfotyrozínu ako markeru fokálnych adhézii. Analýzou pomocou fluorescenčného konfokálneho mikroskopu (Leica TCS SP2, olejový objektív 63x/1,45) sme zistili, že u MEF, ktoré exprimovali CAS s fosfomimikujúcou mutáciou (Y12E), sme zaznamenali veľmi výrazný pokles lokalizácie proteínu CAS do fokálnych adhézii oproti MEF reexprimujúcim nemutovanú formu CAS, pričom Y12F mutácia nemala žiadny efekt (obr. 5.9.). Avšak MEF netvoria výrazné fokálne adhérie a preto sme pre ďalšie experimenty prešli k inému bunkovému modelu.



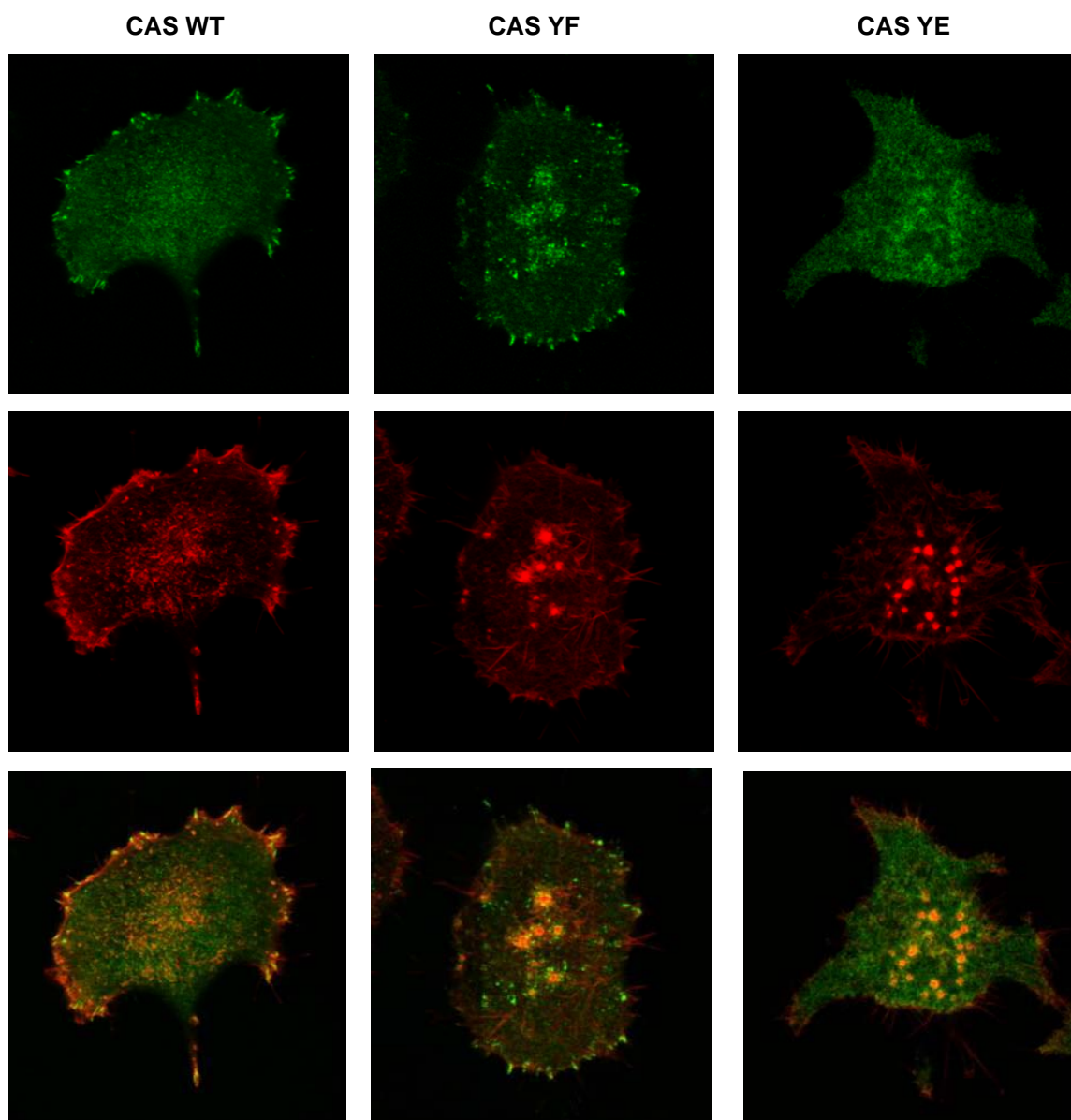
Obr. 5.9. Lokalizácia variant p130Cas v bunke. Nemutovaný CAS i nefosforylovateľná varianta (Y12F) kolokalizujú so signálom protilátky proti fosfotyrozínu čo značí lokalizáciu do fokálnych adhézii (FA). Naproti tomu fosfomimikujúca mutácia (Y12E) nemá výraznejšiu kolokalizáciu s protilátkou proti fosfotyrozínu. (CAS – zelene, protilátka proti fosfotyrozínu(4G10) – červené).

5.3.2. Vplyv Y12E mutácie na lokalizáciu CAS v bunkách sarkómovej línie K4.

Keďže MEF netvorili výrazné fokálne adhérie využili sme líniu K4 (RsK4 – potkanie bunky sponntánneho nádoru následne transformované Src527F), ktorá tvorí výrazné fokálne adhérie. Príprava preparátov pre pozorovanie konfokálnym mikroskopom bola totožná s prípravou MEF (viď vyššie) a použité protilátky boli proti fosfotyrozínu, fosfopaxilinu a proti F-aktinu bol použitý faloidín (markery FA). U K4 buniek sme pozorovali rovnaký vzorec lokalizáciu p130Cas ako u MEF, tj. wild-type varianta ako i Y12F mutácia lokalizovali do FA, pokým varianta Y12E sa nachádzala prevažne v cytoplazme (obr. 5.10., 5.11.)



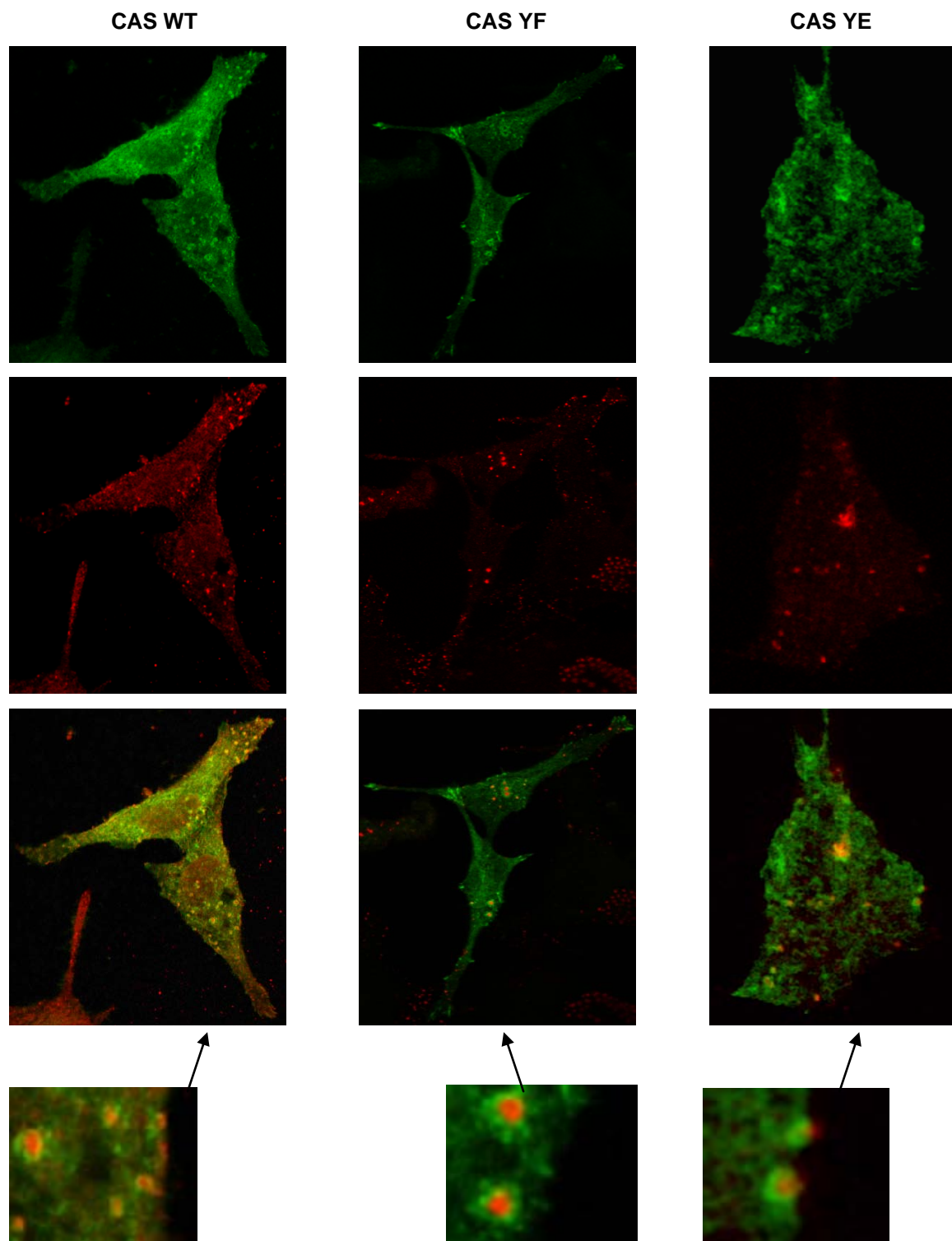
Obr 5.10 Lokalizácia p130Cas v bunkách línie K4. Lokalizácia proteínu CAS v K4 bunkách je analogická k lokalizácii CAS v MEF – Y12F a nemutovaný CAS kolokalizuje s fosfopaxilínom i fosfotyrozínom vo fokálnych adhéziiach a Y12E mutácia je lokalizovaná z väčšej miery difúzne v cytoplazme a s fosfopaxilínom a fosfotyrozínom kolokalizuje len sporadicky (CAS – zelene, fosfopaxilín – žlte, fosfotyrozín – červené)



Obr. 5.11. Lokalizácia p130Cas v bunkách línie K4. (CAS – zelene, F-aktin – červené)

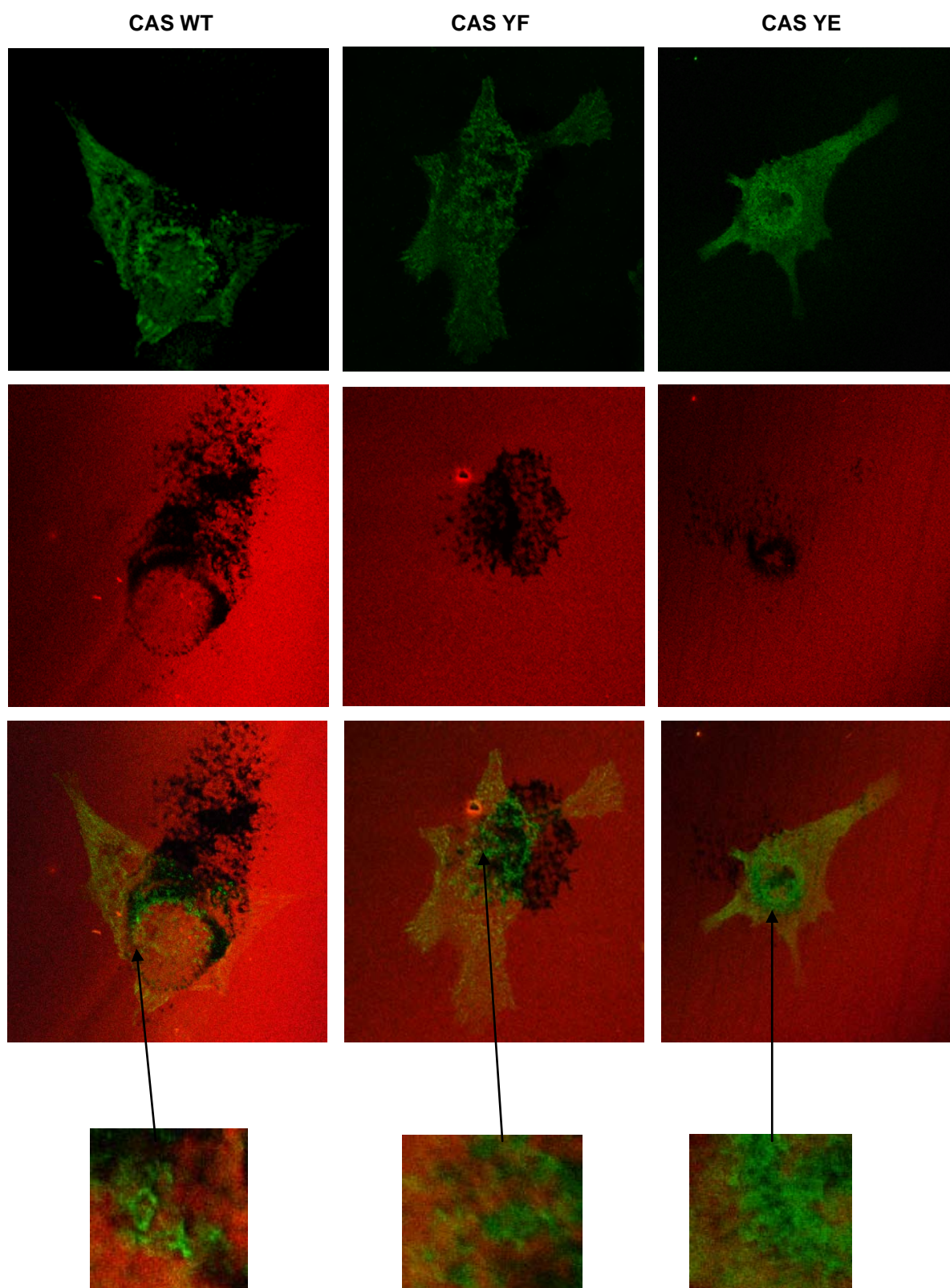
Pri farbení K4 buniek pomocou faloidínu sme si všimli, že aj keď signál CAS s Y12E mutáciou v SH3 doméne mizne z fokálnych adhézii, zostáva v strede bunky v štruktúrach podobajúcich sa na podozomy (štruktúry špecializované na degradáciu mezibunkovej hmoty) (obr. 5.11.). Preto sme experiment zopakovali a na miesto

protilátok proti fosfopaxilínu či fosfotyrozínu (markery FA) sme použili protilátku proti fosfokortaktínu ako markeru podozómov. Obrázky z konfokálneho mikroskopu nám potvrdili, že signál fosfokortaktínu kolokalizoval so signálom proteínu CAS takým spôsobom, že by sa skutočne mohlo jednať o podozómy (obr. 5.12.).



Obr. 5.12. Lokalizácia p130Cas do podozômov. Protein CAS lokalizuje do podozômov v bunkách línie K4 bez ohľadu na to či je SH3 doména nemutovaná alebo je tyrozín12 vymenený za glutamát či fenyalanín. CAS spolu s fosforylovaným kortaktínom vytvárali podozômovú štruktúru – fosfokortaktín sa nachádza v jadre podozômu, pričom CAS ho obkolesuje (CAS – zelene, fosfokortaktín – červené).

Pre úplné potvrdenie toho, že všetky varianty CAS lokalizujú do miest degradácie extracelulárnej hmoty sme sa rozhodli zistiť ako sú na tom bunky línie K4 tranfekované variantami CAS s fokálnou extracelulárnou proteolýzou. Príprava buniek bola obdobná v predchádzajúcich prípadoch, ale tentokrát bunky rástli 24 hodín na krycích sklíčkach pokrytých želatínom konjugovaným s červenou fluorescenčnou farbičkou. Pomocou konfokálnej mikroskopie sme opäť zistili, že všetky varianty CAS tvoria podozômové štruktúry a tieto štruktúry sú miestom degradácie želatínu (obr 5.13.)



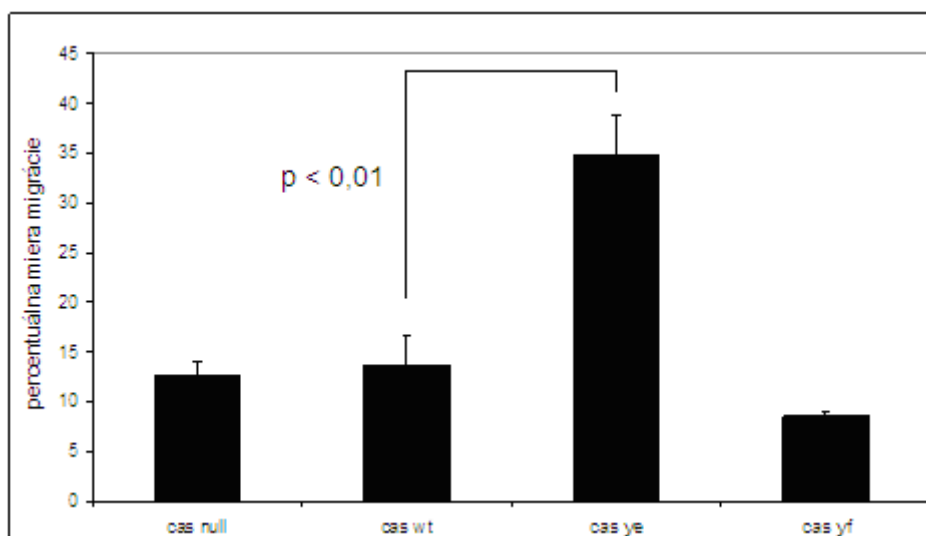
Obr. 5.13. Lokalizácia p130Cas do degradačných štruktúr. Všetky tri varianty proteínu CAS lokalizujú do miest degradácie želatínu (CAS – zelene, nedegradovaný želatín – červené, degradované plochy – čierna).

5.4.Vplyv mutácie tyrozínu 12 na migračný potenciál myších embryonálnych fibroblastov.

Možnosť pohybu je veľmi dôležitá vlastnosť niektorých typov buniek. Proteín CAS je dôležitý pre sprostredkovanie pro-migratorných signálov od proteínov extracelulárnej hmoty. Po aktivácii integrínových receptorov je substrátová doména proteínu CAS fosforylovaná a tak sa vytvoria väzbové miesta pre SH2 domény ďalších proteínov ako napríklad Crk, ktorý následne viaže GTP/GDP výmenný faktor DOCK180. Ten napomôže výmene GDP za GTP v proteíne Rac1, ktorý následne aktivuje komplex Arp2/3. Ten slúži ako nukleačné jadro pre polymeráciu aktínu a následne sa tvoria lamelipódiá a dochádza k bunkovému pohybu. Zapojenie proteínu CAS v tejto dráhe je kriticky dôležité, pretože bunky neexprimujúce proteín CAS mali výrazne zníženú schopnosť migrácie (*Cho and Klemke, 2000*). Dôležitosť SH3 domény proteínu CAS v sprostredkovaní pro-migračných stimulov spočíva v interakcii s kinázou FAK. Bolo dokázané, pri mutovaní prolínov 712 a 715 v prolínovom úseku kinázy FAK, ktoré sú zodpovedné za väzbu na SH3 doménu CAS, bola miera FAK sprostredkovanej migrácie znížená (*Cary et al., 1998*).

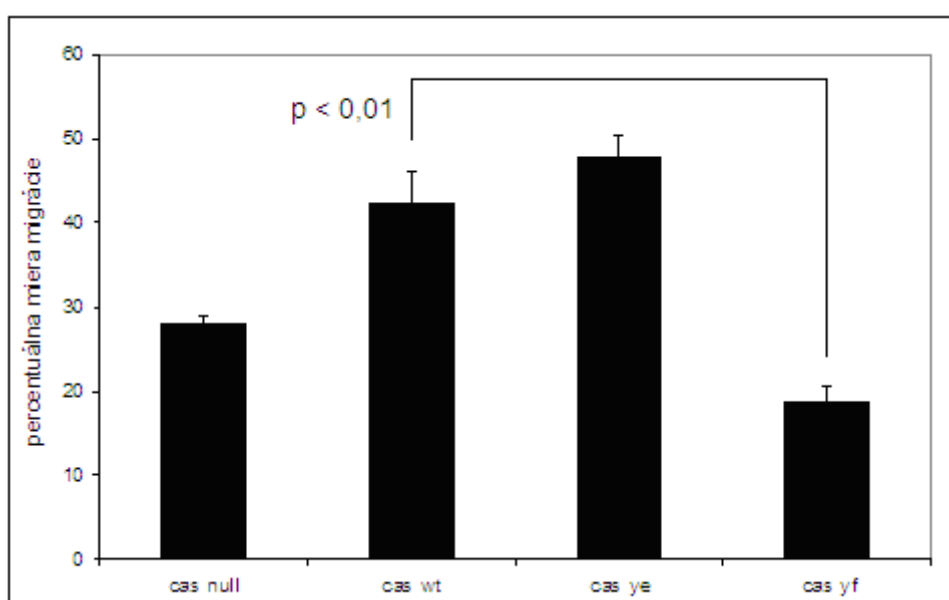
Kedže proteín CAS a taktiež jeho SH3 doména je dôležitá pre migráciu buniek, analyzovali sme migračný potenciál jednotlivých variant. Migráciu buniek sme skúmali niekoľkými spôsobmi, ktoré sú podrobne vysvetlené v časti „ metódy “. Základom týchto metodických postupov bolo vytvorenie priestoru nepokrytého bunkami pomocou nejakého inzertu a následné vytiahnutie tohoto inzertu pričom sa vytvorila voľná plocha pre migrovanie buniek, ktorá sa v čase zmenšovala. Z našich výsledkov vyplýva, že nemutovaný proteín CAS zvyšuje schopnosť myších embryonálnych fibroblastov migrovať v závislosti na fibronektíne, pričom ak boli bunky nechané migrovať na poly-lyzíne, zvýšenie migrácie u nemutovaného CAS nebolo veľmi výrazné. Naproti tomu fosfomimikujúca mutácia Y12E výrazne zvyšovala migračnú kapacitu buniek na poly-lyzíne v porovnaní s CAS-deficientnými fibroblastami i ostatnými CAS-líniami (obr. 5.14. A) a taktiež na fibronektíne (obr. 5.14. B) avšak tam zvýšenie oproti MEF exprimujúcim nemutovaný CAS nebolo až také výrazné, takže mutácia Y12E zvyšuje migráciu nezávisle na fibronektíne. Na druhej strane Y12F mutácia mieru migrácie znižuje pod úroveň fibroblastov neexprimujúcich p130Cas.

A



Obr. 5.14.A. Migrácia MEF exprimujúcich varianty CAS na poly-lyzíne. 50 tisíc buniek bolo vysiatych na 96 jamkovu dosičku s tzv stoprom, ktorý zabránil prisadaniu buniek na dané miesto. Po vytiahnutí sa vytvoril priestor, do ktorého bunky migrovali. Postupné migrovanie buniek do priestoru vytvoreného tzv. stoprom bolo sledované v čase a vyhodnotené jako nárast plochy, do ktorej sa dostali bunky. Miera migrácie MEF exprimujúcich Y12E mutantný CAS je výrazne vyššia ako u ostatných variant. (osa y - % plochy, ktorú bunky obsadili migráciou za čas 10 hodín od štartu migrácie).

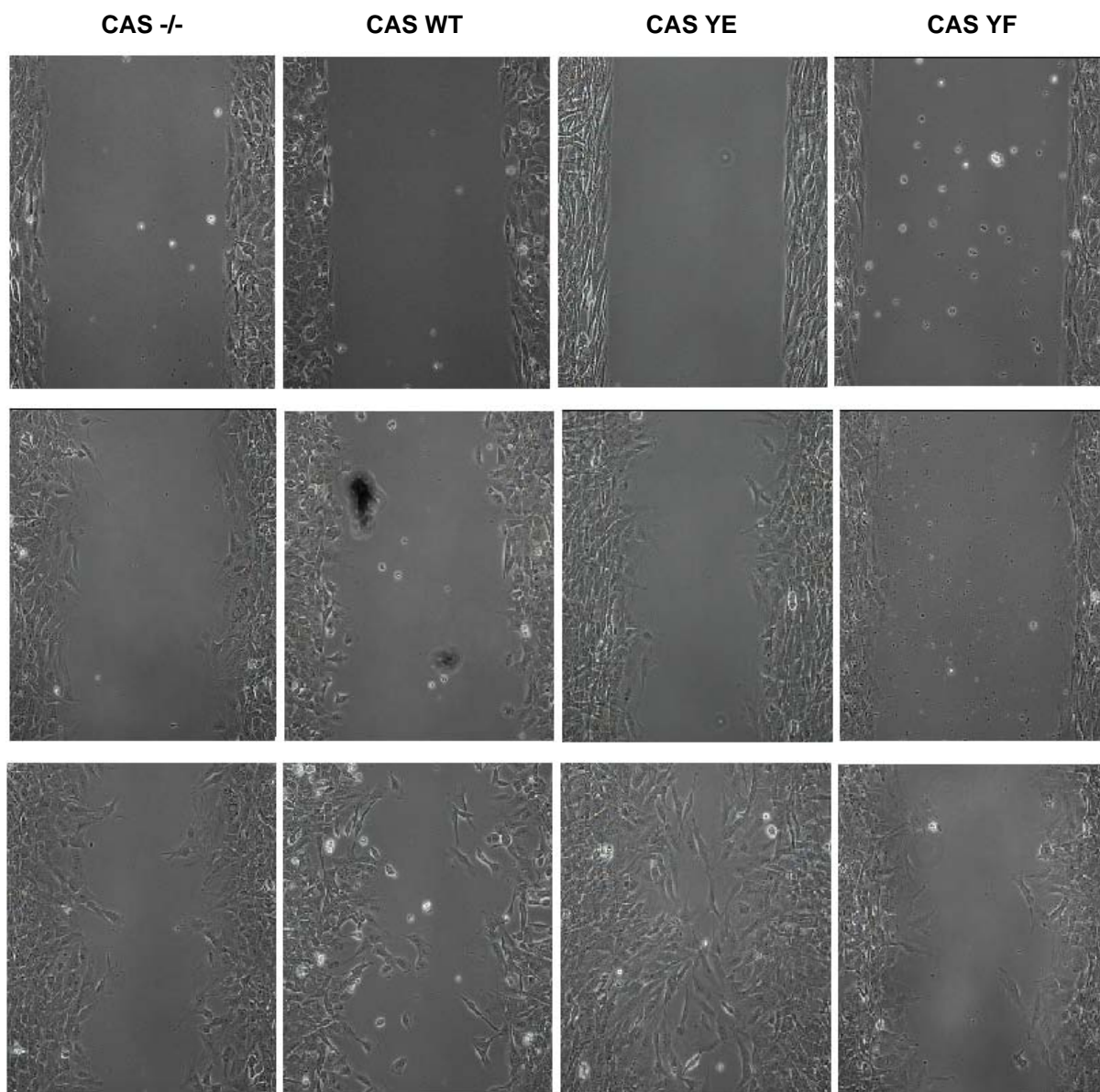
B



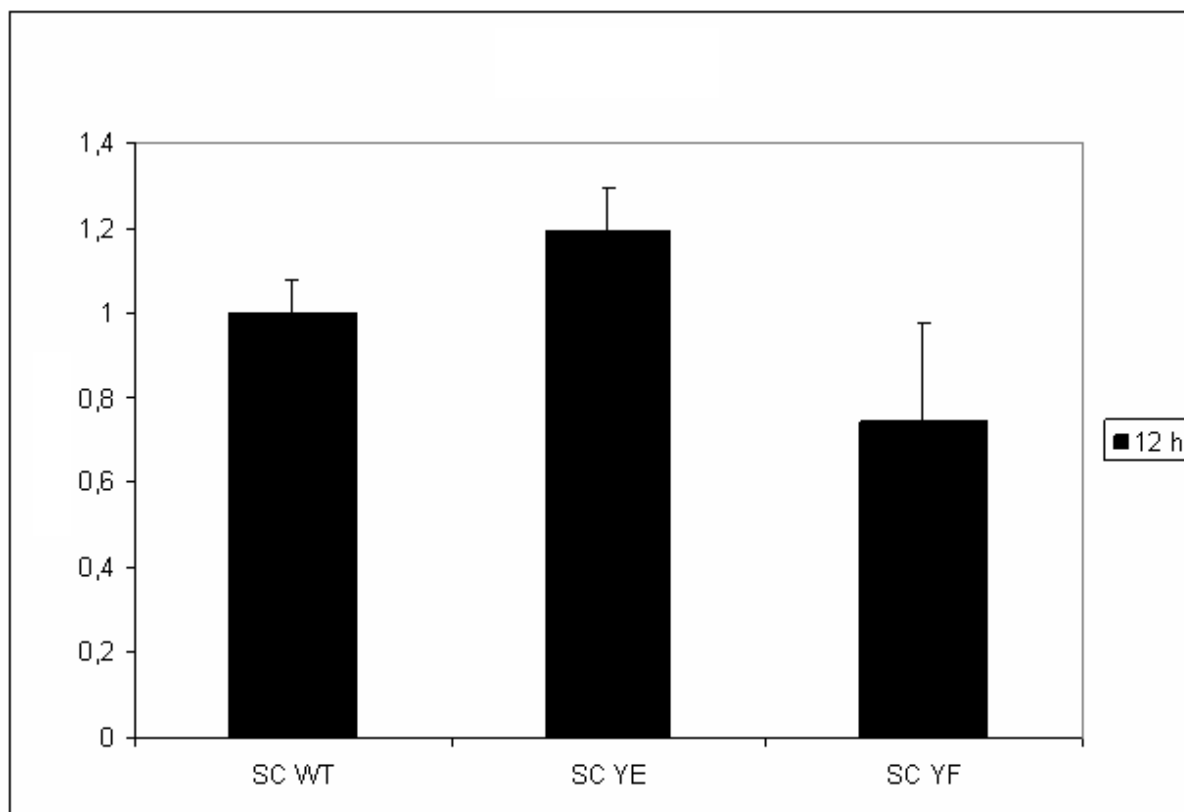
Obr. 5.14.B. Migrácia MEF exprimujúcich varianty CAS na fibronektíne. Opäť bolo 50 tisíc buniek vysiatych na 96 jamkovu dosičku s tzv stoprom, ktorá bola predtým pokrytá fibronektínom. Stoper

zabránil prisadaniu buniek na dané miesto. Po vytiahnutí sa vytvoril priestor, do ktorého bunky migrovali. Postupné migrovanie buniek do vytvoreného priestoru bolo sledované v čase a vyhodnotené jako nárast plochy, do ktorej sa dostali bunky. Miera migrácie MEF exprimujúcich Y12E mutantný CAS je vyššia než u ostatných variant avšak zvýšenie nieje až také výrazné ako pri migrácii na poly-lyzíne. (osa y - % plochy obsadenej migrujúcimi bunkami za čas 10 hodín od štartu migrácie).

C

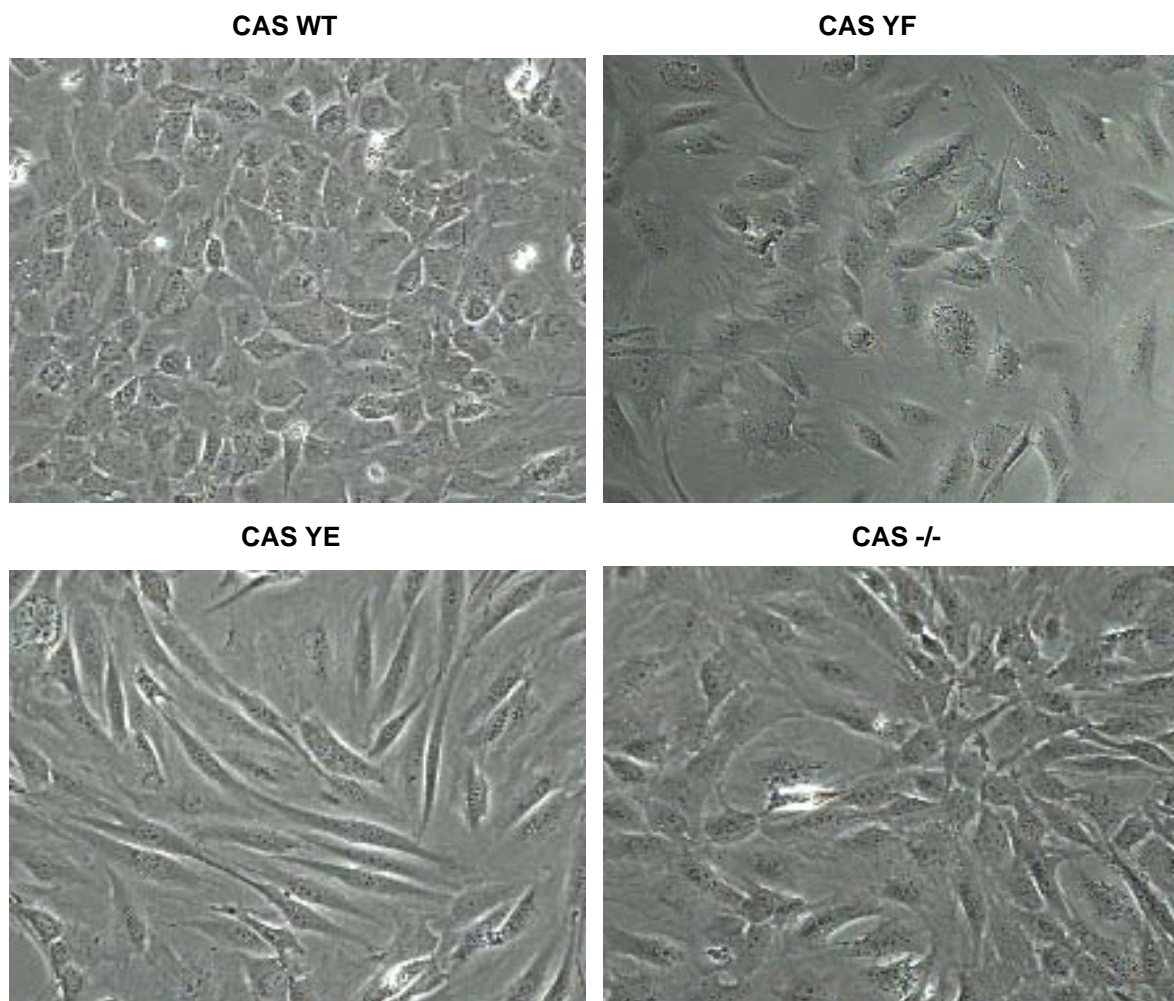


Obr. 5.14.C. Wound healing MEF reexprimujúcich CAS varianty. 70 μ l bunkovej suspenzie ($7 \cdot 10^5$ buniek/ml) bolo aplikované do každej jamky tzv. IBIDI inzertu. Po prisadnutí buniek bol inzert vytiahnutý a vytvoril 200 μ m širokú medzeru, do ktorej bunky migrovali. Postupnú migráciu buniek v priebehu experimentu sme fotili v časových okamžikoch 0h, 5h, 11h. MEF reexprimujúce CAS Y12E zamigrovali danú plochu opäť najrýchlejšie.

D

Obr. 5.14.D. Migrácia Src527F transformovaných MEF na poly-lyzíne. 20 tisíc buniek bolo vysiatych do oboch jamiek IBIDI inzeru a boli ponechané aby konfluente zarástli celú plochu jamiek. Potom bol inzerť vytiahnutý a bunky začali migrovať do medzery. Migrácia SrcF transformovaných MEF reexprimujúcich CAS varianty má rovnaký vzorec ako u netransformovaných avšak rozdiely sú menšie, pretože Src transformované MEF mali celkovo nižšiu migračnú rýchlosť. Migrácia je vyjadrená pomerne k migrácii SrcF transformovaných MEF reexprimujúcich nemutovanú variantu CAS (1).

S migráciou súvisí aj zmena tvaru buniek. U buniek potkanieho adenokarcinomu (MTC, MTLn3) bolo pozorované, že zníženie množstva kofilínu pomocou siRNA viedlo k predĺženiu buniek a zvýšeniu rýchlosti migrácie z dôvodu menšej frekvencie zmeny smeru (Sidani et al. 2007). U myších embryonálnych fibroblastov reexprimujúcich Y12E mutovanú variantu proteínu CAS sme pozorovali predĺžený tvar buniek oproti ostatným líniam (CAS WT, CAS YF, CAS -/-), ktoré si zachovali normálnu morfológiu (obr 5.15.).

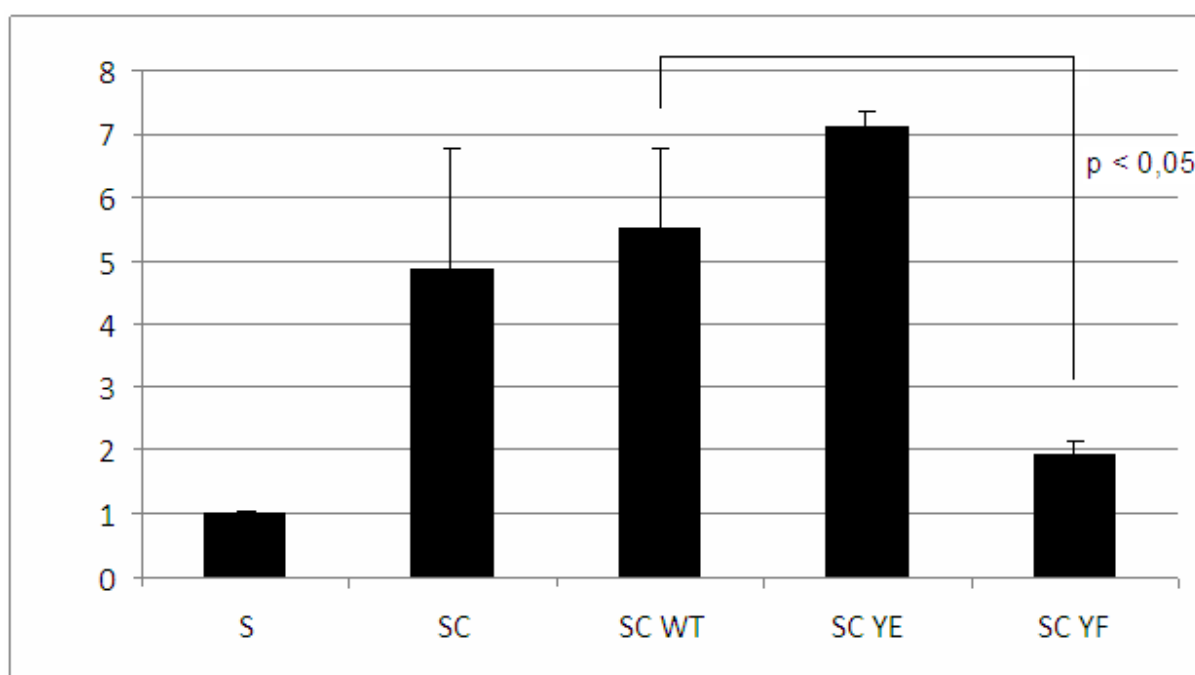


Obr 5.15. Morfológia myších embryonálnych fibroblastov. MEF re-exprimujúce Y12E mutovanú variantu proteínu CAS vykazujú predĺžený tvar buniek v porovnaní s ostatnými líniami. Bunky sa nechali narásť na kultivačných miskách do 100% konfluencie a následne boli vyfotografované pomocou mikroskopu Nikon-Eclipse TE2000-S (10x/0.25 Plan Fluor objektive).

5.5.Vplyv mutácie tyrozínu 12 na *in vitro* invazivitu Src527F transformovaných myších embryonálnych fibroblastov.

Schopnosť invazívneho šírenia sa je dôležitá vlastnosť niektorých typov buniek obzvlášť nádorovo transformovaných. Prienik buniek cez medzibunkovú hmotu je prvým krokom tzv. metastatickej kaskády, ktorá popisuje kritické kroky, ktoré musí nádorová bunka zvládnuť aby mohla vytvoriť sekundárny nádor. Pre invazivitu Src527F transformovaných MEF je kriticky dôležitý proteín CAS. Experimenty preukázali, že Src527F transformované myšie embryonálne fibroblasty neexprimujúce proteín CAS majú výrazne zníženú schopnosť invadovať *in vitro* a

taktiež tvoriť metastázy *in vivo* (Brabek et al., 2004). Z tohoto dôvodu sme analyzovali vplyv mutácie tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS na schopnosť buniek invadovať. Pomocou invazívneho testu v kolagéne sme dokázali, že fosfomimikujúca mutácia Y12E udeľuje transformovaným MEF najväčšiu invazívnu schopnosť v porovnaní s ostatnými Src transformovanými MEF reexprimujúcimi protein CAS či už z puromycínového vektoru alebo z retrovirového transferu. Oproti tomu u Src transformovaných MEF reexprimujúcich Y12F mutantnú variantu CAS bola invazívna kapacita najnižšia zo všetkých CAS reexprimujúcich transformovaných MEF avšak vyššia než u CAS deficientných - S bunky (Obr.5.16.).



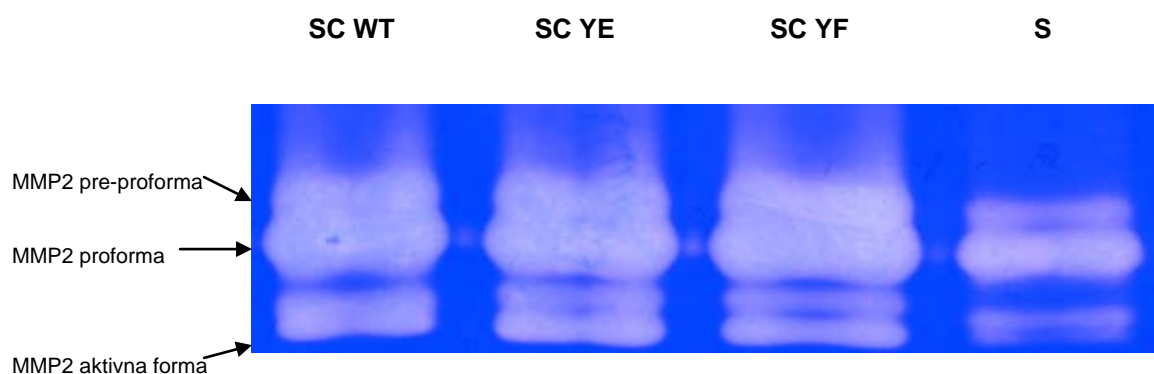
Obr. 5.16. Relatívna invazivita Src527F transformovaných myších embryonálnych fibroblastov. 50 μ l bunkovej suspenzie ($2 \cdot 10^5$ buniek/ ml) bolo aplikovaných na stuhnutý roztok kolagénu. Komôrka s invazívnym testom bola následne umiestnená do kultivačného termo-boxu. Po 72 hodinách bolo 6 nezávislých polí v kolagen s invadovanými bunkami odfotené v rôznych hĺbkach, bunky boli spočítané a invazivita bola vyhodnocená jako pomer k S bunkám (CAS deficientné Src527F transformované MEF). Z grafu vyplýva, že invazivita SC YE buniek je 7x vyššia než S a tiež vyššia oproti líniam exprimujúcim nemutovanú formu proteínu CAS. Avšak exprimovanie Y12F mutantného CAS výrazne znížilo schopnosť invazivity fibroblastov oproti MEF+Src527F exprimujúcim nemutovanú formu CAS.

5.6. Vplyv mutácie tyrozínu 12 na sekréciu enzýmov degradujúcich proteíny extracelulárnej hmoty

Src527F transformované myšie embryonálne fibroblasty sú tzv. mezenchymálne invadujúce bunky. Mesenchymálne invadujúce bunky potrebujú pre prechod medzibunkovou hmotou extracelulárne proteázy aby naštepili proteínové vlákna a tak si vytvorili cestu. Preto jedným z možných vysvetlení zvýšenej invazívnej kapacity Src transformovaných MEF reexprimujúcich CAS Y12E by mohla byť zvýšená produkcia týchto proteáz. Túto hypotézu sme testovali pomocou želatínovej zymografie a degradácie želatínu *in situ*.

5.6.1. Sekrécia matrixovej metaloproteázy 2 (MMP2)

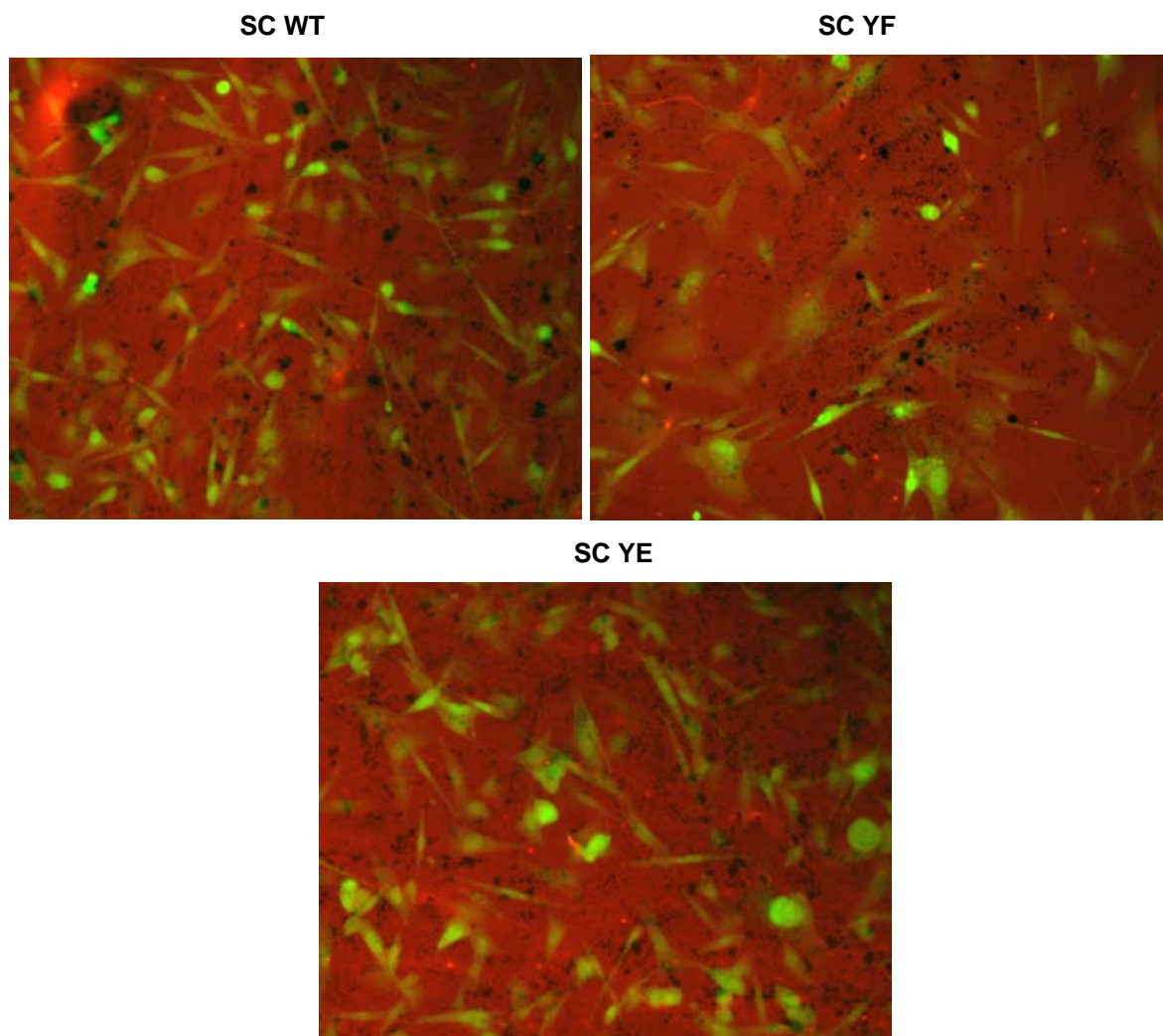
Je známe, že SH3 doména proteínu CAS interaguje s nukleoplazmatickým proteínom CIZ. Tento proteín je dôležitý pre expresiu matrixových metaloproteáz, čo sú enzýmy závislé na zinkových iónoch a vysokou mierou sa podieľajú na degradácii extracelulárnej hmoty. Predchádzajúce experimenty preukázali dôležitosť SH3 domény proteínu CAS pre aktiváciu matrixovej metaloproteázy II v Src527F transformovaných MEF (*Brabek et al., 2004*). Rolu fosforylácie tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS v aktivácii sme zisťovali pomocou želatínovej zymografie. 50 000 buniek bolo vysiatych do jamiek v 24 jamkovej doske. Po prisadnutí im bolo vymenené médium za bezsérové a po 72 hodinách boli odobrané aliquoty. Tieto vzorky boli rozdelené pomocou polyakrylamidovej elektroforézy, kde sa namiesto vody pridal roztok želatínu. Po dobehnutí sa gél premyl v renaturačnom pufré a umiestnil do aktivačného roztoku pre aktiváciu proteáz a nechal cez noc v termostate. Na druhý deň sa gél ofarbil a miesta, kde sa nachádzali proteázy zostali neofarbené, keďže tam bol želatín z gelu degradovaný. Zo zymografu vyplýva, že fosforylácia tyrozínu 12 nehrá kritickú úlohu pri aktivácii MMP2 u Src transformovaných MEF, pretože všetky línie reexprimujúce CAS (SC WT, SC YE, SC YF) zvyšovali aktiváciu v rovnakom miere (obr. 5.17.), takže sa zdá že pre aktiváciu MMP2 je skôr dôležitá intaktná SH3 doména CAS.



Obr. 5.17. Aktivita matrixovej metaloproteázy 2 v kondiciovanom médiu u SrcF transformovaných MEF. Aktivity MMP2 je u všetkých líníach SrcF transformovaných MEF reexprimujúcich varianty proteínu CAS zvýšená v rovnakej miere oproti CAS deficientným SrcF transformovaným MEF.

5.6.2. In situ degradácia želatínu.

Okrem matrixovej metaloproteázy 2, ktorej aktivita sa v mnou pripravených líníach nelíši, nádorové bunky exprimujú ešte ďalšie degradačné enzýmy (ďalšie typy matrixových metaloproteáz, serinové proteázy, cathepsíny....), ktorých aktivitu sme na želatínovej zymografii nezaznamenali. Preto sme použili fluorescenčne značený želatín, ktorým sme pokryli krycie sklíčka. Výhodou tohoto postupu oproti želatínovej zymografii je to, že sme boli schopní detekovať aktivitu akýchkoľvek želatináz vylučovaných bunkami. Na takto pripravené krycie sklíčka sme vysiali dostatočný počet SrcF transformovaných MEF reexprimujúcich varianty CAS a po 36 hodinách sme bunky na sklíčkach zafixovali a fotodokumentovali. Z urobených snímok sme však ani v tomto prípade nezistili žiadny rozdiel v sekrécii ostatných želatín degradačných enzýmov (obr.5.18.)



Obr. 5.18. Degradácia želatínu in situ. Všetky línie SrcF transformovaných MEF reexprimujúcich varianty CAS proteínu degradovali želatín na sklíčkach rovnako (GFP – zelene, nedegradovaný želatín – červené, degradované plochy – čierne)

5.7. Vplyv mutácie tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS na dynamiku fokálnych adhézií ako i proteínov v nich.

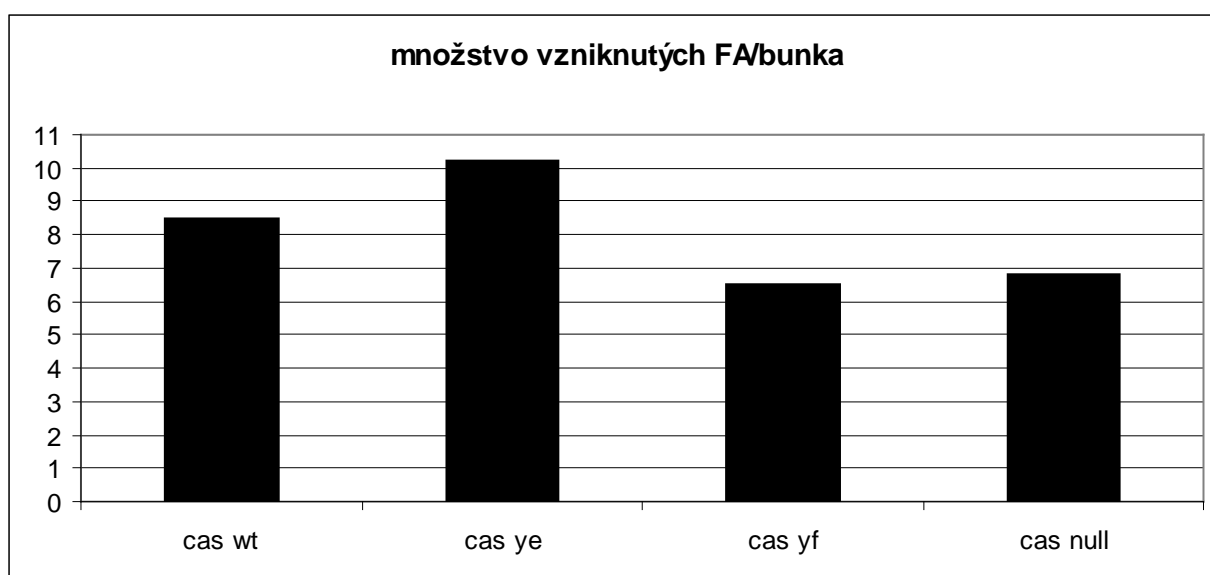
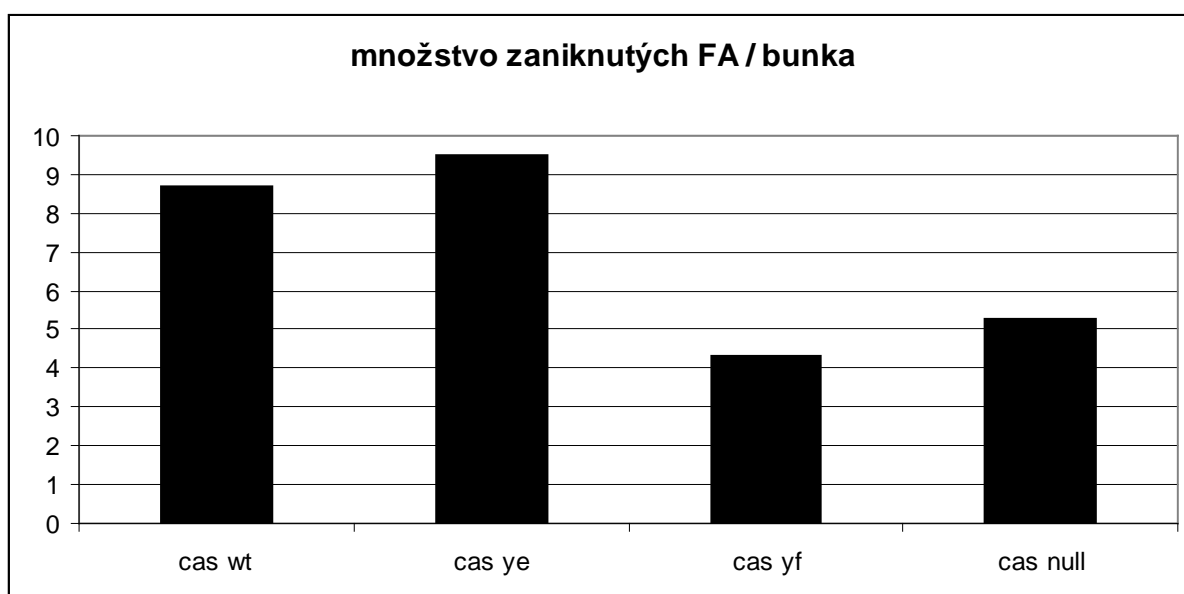
Rozdiely v migračnom a invazivnom potenciály buniek reexprimujúcich varianty proteínu CAS môžu byť spôsobené jednak rozdielnou sekréciou enzýmov degradujúcich extracelulárnu hmotu (čo však nebolo dokázané) alebo sú zapríčinené rozdielnou dynamikou cytoskeletu. S dynamikou cytoskeletu úzko súvisí i dynamika fokálnych adhézií. Preto sme sa rozhodli zistiť či za zvýšenou motilitou buniek nestojí práve väčšia dynamika fokálnych adhézií. Zvolili sme dva metodické

prístupy. Najprv sme pomocou IRM (interference reflection microscopy) zisťovali dynamiku celých fokálnych adhézii a potom sme pomocou FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) skúmali dynamiku proteínov adhezívnych plakov (p130Cas, vinculin).

5.7.1. Dynamika fokálnych adhézii (IRM)

Interferenčná reflexná mikroskopia (IRM) je metóda, pomocou ktorej je možné definovať vzdialenosť bunkových štruktúr pod telom bunky od krycieho sklíčka, na ktorom sú prisadnuté. Pomocou vhodne nastaveného rozmedzia snímania emisného spektra GFP, je možné dosiahnuť zobrazenie bunkových štruktúr na ventrálnej strane bunky pomocou čierno-bielej farebnej škály. Časti bunky, ktoré sú v tesnom kontakte s podkladom sa zobrazia ako čierne pričom so zväčšujúcou sa vzdialenosťou od podkladu sa štruktúry javia svetlejšie, takže najsvetlejšie štruktúry sú najvzdialenejšie od podkladu.

Myšie embryonálne fibroblasty reexprimujúce mutantné varianty proteínu CAS boli vysiate na misky so skleneným dnom určené pre konfokálnu mikroskopiю. Porvch sklenených častí bol pokrytý fibronektínom, aby sme dosiahli výraznejšiu tvorbu fokálnych adhézii. Po 24 hodinách bola dynamika fokálnych adhézii analyzovaná pomocou konfokálneho mikroskopu. 10 buniek od každej varianty bolo postupne fotodokumentovaných po dobu 15 minút s intervalom 10 sekúnd. Následne boli snímky spojené do videa a množstvo vzniknutých a zaniknutých FA bolo spočítané manuálne. Z vyhodnotených videí vyplýva, že MEF reexprimujúce fosfomimikujúcu Y12E mutantnú variantu proteínu CAS majú najväčšie množstvo vzniknutých a zaniknutých FA vztiahnuté na 1 bunku. Menšiu dynamiku FA majú MEF reexprimujúce nemutovanú formu proteínu CAS (obr A, B) čo je konzistentné s výsledkami z migračných experimentov. CAS deficientné MEF a MEF reexprimujúce Y12F variantu CAS majú približne rovnaké množstvo vzniknutých adhézii (menšie než WT CAS i Y12E CAS) (obr. 5.19. A), ale rozdiel bol v množstve zaniknutých FA (obr. B). MEF reexprimujúce Y12F CAS mali signifikantne znížené množstvo zaniknutých adhézii čo naznačuje, že nefosforylovateľná varianta CAS pravdepodobne stabilizuje fokálne adhérie a blokuje ich rozpad (obr.5.19.B).

A**B**

Obr. 5.19.A Množstvo vzniknutých fokálnych adhézii u MEF. MEF reexprimujúce CAS varianty boli 24 hodín kultivované v termo-boxe na miskách so skleneným dnom pokrytým fibronektinom. Následne boli 15 minút snímané pomocou konfokálneho mikroskopu. Zo snímok vyplýva, že mutácia Y12E CAS zvyšuje množstvo vzniknutých FA nad úroveň nemutovaného CAS proteínu a taktiež nad úroveň Y12F varianty CAS i CAS deficientných MEF. **B Množstvo zaniknutých fokálnych adhézii u MEF** MEF reexprimujúce CAS varianty boli opäť 24 hodín kultivované v termo-boxe na miskách so skleneným dnom pokrytým fibronektinom. Následne boli 15 minút snímané pomocou konfokálneho mikroskopu. Zo snímok vyplýva, že mutácia Y12E CAS zvyšuje množstvo zaniknutých FA nad úroveň nemutovaného CAS proteínu a taktiež nad úroveň Y12F varianty CAS i CAS deficientných MEF.

Oproti miere vzniku FA je výraznejší pokles zániku FA u MEF reexprimujúcich Y12F CAS čo naznačuje stabilizáciu FA zapríčinenú mutáciou tyrozínu za nefosforylovateľný fenylalanín.

5.7.2.Dynamika proteínov asociovaných s fokálnymi adhéziami

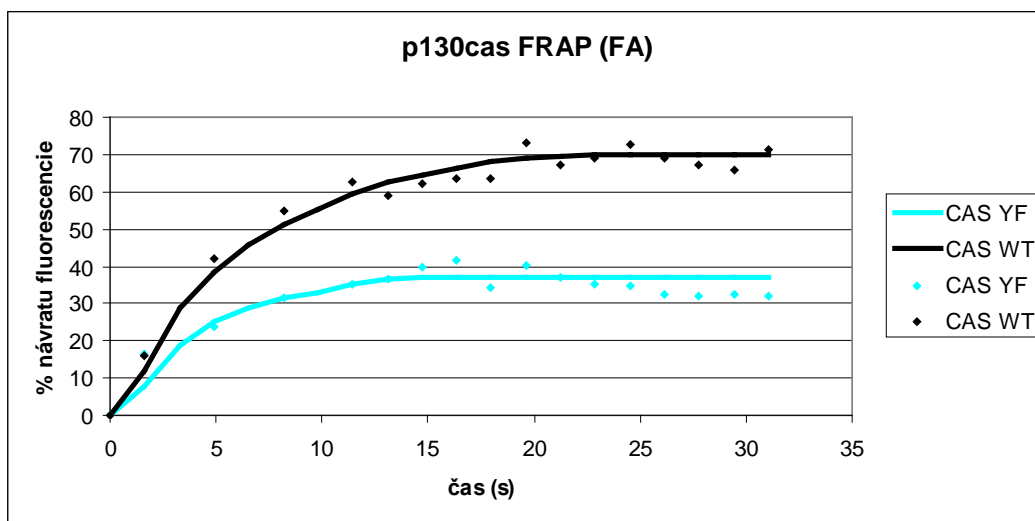
Dynamika proteínov asociovaných s fokálnymi adhéziami priamo súvisí so životnosťou týchto štruktúr. Čím je dynamika proteínov väčšia tým môžu fokálne adhérie rýchlejšie vznikať a tiež zanikať. Pre skúmanie dynamiky proteínov sme sa rozhodli použiť metódu FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching). Predpokladom k použitiu tejto metódy je použitie proteínov fúzovaných s fluorescenčnými proteínmi, v našom prípade GFP a YFP, ktorých fluorescencia je časovo obmedzená a po ožiarení silným pulzom excitačnej vlnovej dĺžky sa vysvietia. Ak sa takto fúzané proteíny nachádzajú v určitej oblasti v bunke, v našom prípade vo fokálnych adhériách, a na túto oblasť sa pustí silný pulz žiarenia, celková fluorescencia v danej oblasti sa zníži. Následne je možné pozorovať opätovný nárast fluorescencie, ktorý je zapríčinený výmenou proteínov s už vysvietenými fluoroformami za nevysvietené. Podľa rýchlosti návratu fluorescencie môžeme posudzovať dynamiku daného proteínu. Čím je návrat fluorescencie rýchlejší tým je proteín slabšie viazaný v danej oblasti a tým je jeho dynamika väčšia.

Pre naše experimenty sme zvolili proteín CAS fúzaný s GFP a proteín vinculin fúzaný s YFP. GFP fúzaný proteín CAS bol štandardne transfekovaný do buniek línie K4. Na druhý deň po transfekcii boli bunky premiestnené na misky so skleneným dnom určené pre konfokálnu mikroskopiu. Sklenené časti boli opäť pokryté fibronektínom. Po 24 hodinách boli bunky analyzované metódou FRAP pomocou konfokálneho mikroskopu. Ako prvá bola analyzovaná dynamika proteínu CAS vo fokálnych adhériách. Analyzované boli len nemutovaná forma CAS a Y12F mutanta, pretože Y12E mutanta nelokalizovala do fokálnych adhérií. FRAP experimentom bolo zistené, že obe varianty (WT CAS i Y12F CAS) mali rovnaký čas dosiahnutia polovičnej intenzity fluorescencie ($T^{1/2}$) vzhľadom na svoje plató intenzity (bod, pri ktorom sa intenzita fluorescencie prestane zvyšovať) tj. 4 sekundy avšak nemutovaná forma CAS dosiahla plató pri 70% pôvodnej intenzity a Y12F už pri 37% pôvodnej intenzity (obr 5.20.A). Vzhľadom k faktu, že Y12E mutanta síce

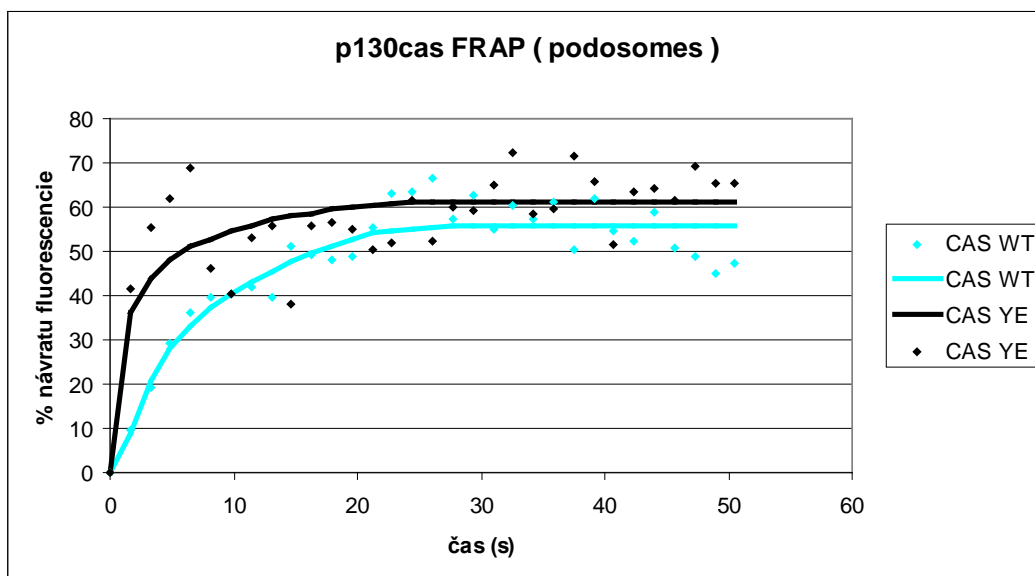
nelokalizovala do fokálnych adhézii, ale zostávala lokalizovaná v podozónoch sme ako druhú analyzovali dynamiku proteínu CAS v podozónoch. V tomto prípade sme plánovali len doplniť informáciu o dynamike Y12E varianty, takže sme FRAP experiment v podozónoch urobili len s nemutovanou formou CAS a Y12E variantou. Postup prípravy buniek aj celého prevedenia experimentu bol totožný s predchádzajúcim avšak tento krát sme laserom nevypálili fokálne adhérie, ale podozómy. Z vyhodnotenia experimentu vyplynulo, že nemutovaný CAS a tiež Y12E mutovaná varianta dosahujú plató návratu intenzity fluorescence približne pri 60% pôvodnej intenzity avšak fosfomimikujúca varianta CAS dosiahne polovičnú intenzitu už pri 1,5 sekundách pričom nemutovanej variante to trvá 4,5 sekundy (obr 5.20. B).

Druhým proteínom, ktorého dynamika vo fokálnych adhéziách bola skúmaná je vinculin. Ako je známe vinculin hrá dôležitú úlohu pri maturácii FA takže jeho dynamika priamo súvisí s dynamikou FA. Preto nás zaujímalo ako a či vôbec má mutácia tyrozínu 12 vplyv na dynamiku tohoto proteínu. Pre FRAP experiment boli Src527F transformované MEF reexprimujúce varianty proteínu CAS transferované YFP značeným vinculinom. Opäť boli na druhý deň premiestnené na fibronektínom pokryté misky pre konfokálnu mikroskopiu a kultivované 24 hodín. Po tejto dobe boli podrobené FRAP experimentu. Z kriviek vyplýva, že opäť najväčšiu dynamiku má vinculin v bunkách reexprimujúcich fosfomimikujúcu variantu proteínu CAS, keďže počas dosiahnutia plató bol 9,5 sekúnd, pričom intenzita v plató dosiahla 100% pôvodnej intenzity (obr. 5.20.D). U fibroblastov reexprimujúcich nemutovanú formu CAS alebo nefosforylovateľnú variantu bola hodnota intenzity plató 80% z pôvodnej hodnoty, avšak intenzita fluorescence u fibroblastov reexprimujúcich nemutovanú formu CAS dosiahla polovičnú intenzitu za 14,6 sekúnd pričom intenzita fluorescence fibroblastov reexprimujúcich Y12F mutovanú variantu CAS polovičnú intenzitu dosiahla až za 24,5 sekúnd (obr. 5.20. C,E).

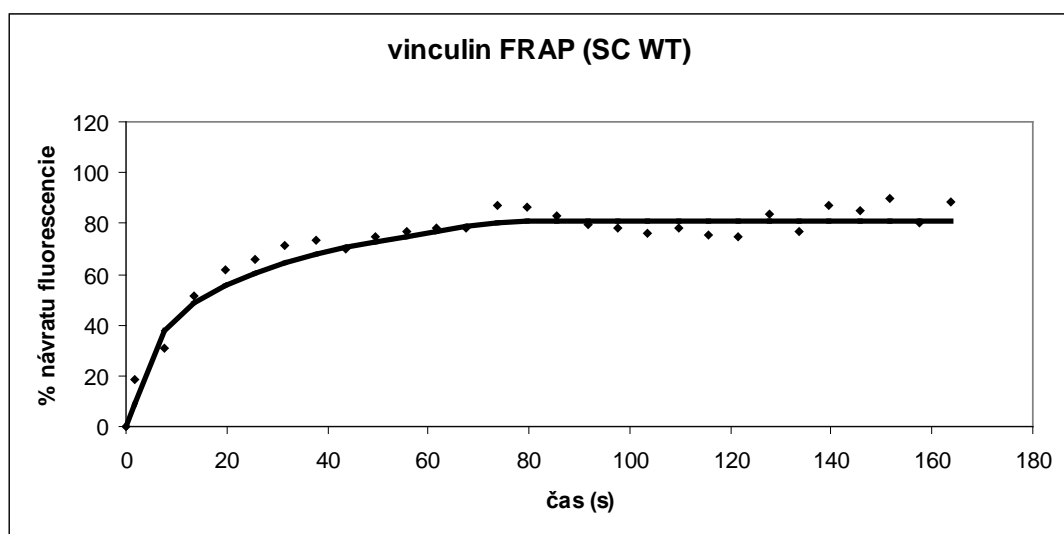
A



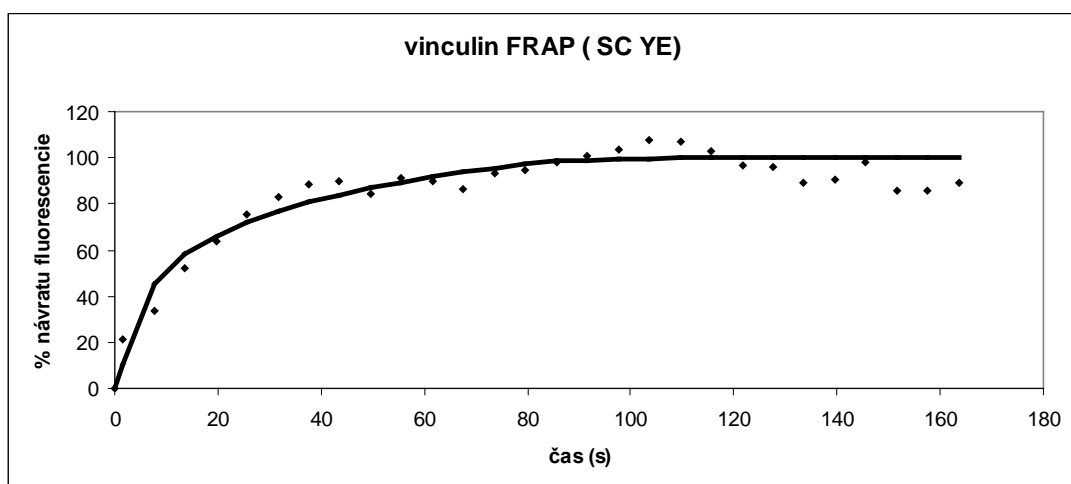
B



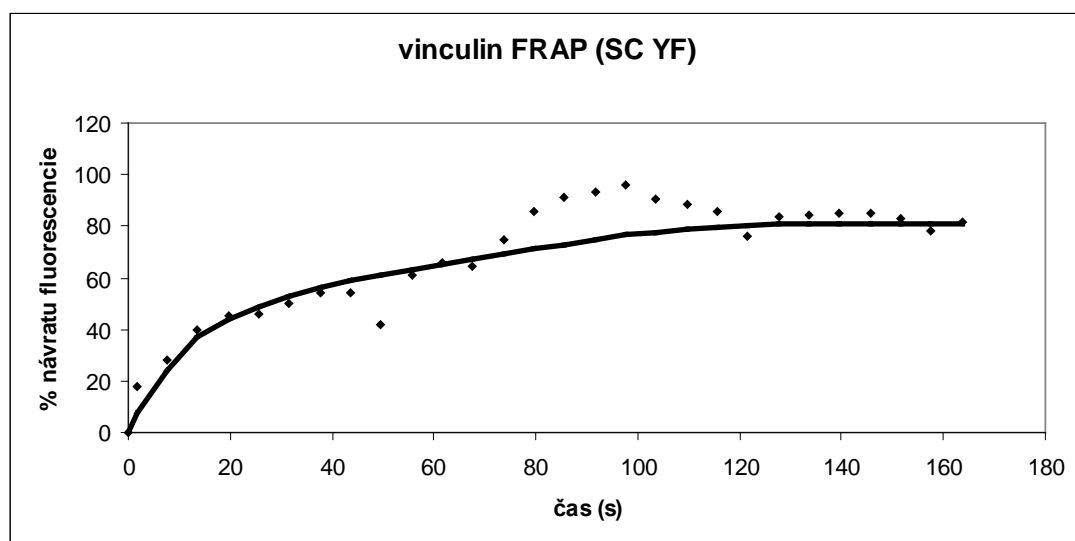
C



D



E



Obr. 5.20.A FRAP nemutovaného CAS a Y12F mutácie vo fokálnych adhéziiach buniek línie K4.

Bunky boli transfekované GFP značeným CAS proteínom a po 48 hodinách bol prevedený FRAP experiment. Body na grafe zobrazujú priemerné hodnoty intenzity fluorescence v jednotlivých časoch po aplikovaní silného laserového pulzu získané z 10-tich FA, každá z inej bunky. Obe varianty majú rovnaké čas dosiahnutia polovičnej intenzity plató (4 s), ale CAS WT dosiahol plató pri 70% pôvodnej intenzity kým CAS Y12F už pri 37%. **B. FRAP krivka nemutovaného CAS proteínu a Y12E varianty v podozómoch buniek línie K4.** Prevedenie i vyhodnotenie experimentu bolo totožne spredchádzajúcim prípadom s rozdielom, že tento krát boli vysvietené podozomy. Obe varianty (WT CAS i Y12E CAS) dosiahli rovnakú intenzitu plató tj. 60% ale polčas návratu fluorescence Y12E CAS bol výrazne kratší (1,5 s) než u CAS WT (4,5 s). **C,D,E. FRAP krivky vinculinu vo fokálnych adhéziiach v Src527F transformovaných MEF reexprimujúcich varianty CAS.** Src transformované MEF boli transfekované YFP značeným vinculinom. Po transfekci boli fibroblasty prenesené na fibronektínom pokryté misky pre konfokálnu mikroskopiu a po 24 hodinách podrobené FRAP experimentu. Zistili sme, že vinculin má najväčšiu dynamiku v CAS Y12E reexprimujúcich MEF s polčasom 9,5 sekúnd a plató 100%. Vinculin v MEF reexprimujúcich nemutovaný CAS a Y12F dosiahol plató 80% pôvodnej intenzity no v SC WT fibroblastoch dosiahol polčas za 14,6 sekúnd pričom v SC YF fibroblastoch za 24,5 sekúnd čo značí že vinculin má celkovo nižšiu dynamiku vo fokálnych adhéziiach než protein CAS a nefosforylovateľná mutácia Y12F túto dynamiku ešte znižuje. Naproti tomu fosfomimikujúca mutácia Y12E dynamiku vinculinu zvyšuje.

Z FRAP experimentov s fluorescenčne značenými proteínami p130Cas a vinculin sme vyvodili, že fosfomimikujúca mutácia v SH3 doméne proteínu CAS (Y12E) zvyšuje mobilitu týchto dvoch proteínov vo fokálnych adhéziiach a u CAS proteínu i v podozómoch. Na druhej strane Y12F nefosforylovateľná mutácia pravdepodobne spôsobuje silnejšiu väzbu proteínu CAS do fokálnych adhézii a tým pádom i jeho zníženú dynamiku. Taký istý efekt mala nefosforylovateľná mutácia CAS (Y12F) i na dynamiku vinculinu v FA (znižuje mobilitu vinculinu). Znížená dynamika týchto dvoch proteínov v FA je pravdepodobne jednou z príčin zníženej dynamiky celých fokálnych adhézii u MEF, pretože dynamika jednotlivých proteínov fokálnych adhézii priamo ovplyvňuje dynamiku fokálnych adhézii ako takých a nadväzuje na bunkovú migráciu (Goetz *et al.*, 2009).

Diskusia

Táto práca prispieva k objasneniu úlohy tyrozínovej fosforylácie v SH3 doméne ako všeobecnému regulačnému mechanizmu väzbovosti SH3 domén. V užšom slova zmysle prináša objav nového regulačného mechanizmu, ktorý ovplyvňuje bunkové deje sprostredkované proteínom CAS. Z prvotných výsledkov Dr. Brábka vyplýva, že Y12E mutácia v SH3 doméne CAS spôsobí zrušenie väzby na polyprolínové sekvencie kinázy FAK i fosfatázy PTP-PEST. Práve tyrozín 12 ako v SH3 doméne je vysoko konzervované fosforylačné miesto v sekvenciách SH3 domén rôznych proteínov (*Nore et al., 2002, Erpel et al., 1995, Chen et al., 2008, Li et al., 2001*). Fosforylácia týchto konzervovaných tyrozínov výrazne ovplyvňuje signalizačné vlastnosti daných proteínov. Fosforylácia tyrozínu 209 v C terminálnej SH3 doméne proteínu Grb2 spôsobila zrušenie väzby k mSOS. V bunkách exprimujúcich Bcr/Abl fúzny proteín, výmena Tyr209 za fenylalanín spôsobila zvýšenú aktiváciu ERK a transformáciu fibroblastov indukovanú týmto fúznym proteínom (*Li et al., 2001*). Na druhej strane fosforylácia Tyr89 u c-Abl zvyšovala jej transformačný potenciál, pretože inhibovala inhibičnú interakciu SH3 domény s katalytickým jadrom kinázy c-Abl (*Chen et al., 2008*). Z vyššie uvedených príkladov vyplýva dôležitosť regulácie väzbových schopností SH3 domény pre funkčnosť proteínov.

Jednou z funkcií proteínu CAS ako adaptorového proteínu je sprostredkovanie tyrozínovej fosforylácie. Potvrdzujú to experimenty s Src527F transformovanými myšimi embryonálnymi fibroblastmi, ktoré neexprimovali proteín CAS. V týchto fibroblastoch bola výrazne znížená tyrozínová fosforylácia integrín-asociovaných substrátov kinázy Src ako sú kináza FAK (Y397,Y576/7,Y861) a ďalší adaptorový proteín paxilín (Y118) (*Brábek et al., 2004*). Keďže SH3 doména sprostredkováva interakciu s kinázou FAK predpokladali sme, že mutácia tyrozínu 12 bude afektovať túto fosforyláciu. MEF transformované aktivovanou variantou Src exprimujúce Y12E fosfomimikujúcu mutáciu mali zníženú fosforyláciu jednak Y397 a tiež Y861, u ktorého bolo toto zníženie výraznejšie. Množstvá týchto fosfotyrozínov sa rovnali množstvám fosfotyrozínov u MEF+Src527F CAS deficientných buniek. Menej výrazné zníženie fosforylácie Y397 oproti Y861 je spôsobené tým, že Y397 je autofosforylačné miesto na kináze FAK a autofosforyluje sa po aktivácii integrínových

receptorov takže leží v integrínovej signálnej dráhe vyššie od CAS. Na druhej strane Y861 je fosforylovaný kinázou Src v rámci komplexu FAK-CAS-Src takže v tomto prípade má znížená asociácia FAK s CAS výraznejší efekt na túto fosforyláciu (zhrnuté v *Hanks et al., 2003*). Efekt mutácie tyrozínu 12 sa však u paxilínu neprejavil, čo je pravdepodobne dôsledkom nie priamej asociácie týchto dvoch proteínov alebo iným mechanizmom fosforylácie paxilínu.

Proteín CAS môže mať v bunke dve rozdielne lokalizácie. Je lokalizovaný buď v cytoplazme alebo po aktivácii integrínových receptorov je fosforylovaný a nachádza sa vo fokálnych adhéziiach (*Sakai et al., 1994, Fonseca et al., 2003*). významnú úlohu v lokalizácii CAS do fokálnych adhézii hrá N-koncová SH3 doména (*Nakamoto et al., 1997*) avšak lokalizačný signál do fokálnych adhézii má aj tzv. CCH doména na C-konci (*Donato et al., 2010*). SH3 doména má výraznejší vplyv než CCH doména a tak bolo pravdepodobné, že mutácia tyrozínu 12 v SH3 doméne spôsobí nejaké zmeny v lokalizácii. Fosfomimikujúca varianta proteínu CAS Y12E zapríčinila výraznú stratu proteínu CAS z fokálnych adhézii netransformovaných MEF, pričom nefosforylovateľná mutácia Y12F nemala žiadny efekt. U buniek sarkómovej línie K4 fosfomimikujúca mutácia Y12E taktiež spôsobila delokalizovanie proteínu CAS z fokálnych adhézii, avšak nespôsobila stratu proteínu CAS z podozómov. Náš výsledok je konzistentný so zisteniami Nakamota a spolupracovníkov, že po transformovaní MEF pomocou 527F-c-Src proteín CAS vo väčšej miere lokalizoval do podozómov a táto lokalizácia bola závislá intaktnej Src-väzbovej domény v C koncovej časti proteínu CAS (*Nakamoto et al., 1997*). Zdá sa, že okrem kinázy Src ako proteínu, ktorý lokalizuje CAS do podozómov hrá dôležitú úlohu v tomto procese aj kináza FAK. Bolo dokázané, že v bunkách MTLn3, ktoré mali pomocou siRNA znížené množstvo kinázy FAK bola väčšina fosforylovaného proteínu CAS lokalizovaná v podozómoch, oproti MTLn3 bunkám normálne exprimujúcim FAK kde bola väčšina fosforylovaného CAS vo fokálnych adhéziiach. Z ďalších výsledkov tejto výskumnej skupiny vyplýva, že FAK reguluje rovnováhu tyrozínovej fosforylácie medzi podozómami a fokálnymi adhéziami pretože rovnaký vzorec lokalizácie mal i ďalší adaptorový proteín – paxilin (*Chan et al., 2009*). V našom prípade by sme depléciu FAK mohli prirovnáť k zníženej asociácii SH3 domény proteínu CAS s kinázou FAK čo spôsobili slabšiu väzbu CAS proteínu do fokálnych adhézii a následný presun do podozómov. Ďalším proteínom, ktorý sa môže podieľať na lokalizácii CAS v bunke je GTP/GDP výmenný faktor BCAR3 (Breast Cancer

Antiestrogen Resistance 3) . BCAR3 asociuje s C-koncovou časťou proteínu CAS a lokalizuje ho na membránu. V nádorových bunkách odvodených od nádoru prsníka s vysokými hladinami BCAR3 je CAS výrazne lokalizovaný na membráne pričom táto lokalizácia koreluje s aktiváciou Src na membráne a následným zvýšením motility buniek. Naopak v rakovinných bunkách, ktoré nemajú vysoký migračný a invazívny potenciál je proteínu BCAR3 málo, čo je i konzistentné s výsledkami, deplécia BCAR3 z buniek s vysokou motilitou spôsobila zníženie ich motilného potenciálu (*Schrecengost et al., 2007, Schuh et al., 2009*). Z vyššie uvedeného vyplýva, že ako následok zníženej asociácie CAS Y12E s fokálnymi adhéziami môže byť jeho zvýšená asociácia s proteínom BCAR3 a jeho relokalizácia na membránu a zvýšená tvorba komplexu CAS-BCAR3-Src na membráne čo potencuje migráciu, čo je konzistentné aj s našimi výsledkami (CAS Y12E zvyšuje migráciu myších embryonálnych fibroblastov). Zdá sa, že v SH3 doméne sa nachádza dominantný lokalizačný signál do fokálnych adhézii cez asociáciu s kinázou FAK, pričom zamedzenie tejto interakcii môže uvoľniť proteín CAS pre interakciu s ďalšími bunkovými proteínmi a jeho následnú relokalizáciu do iných častí bunky.

Proteín CAS je hrá dôležitú úlohu v sprostredkovaní bunkovej migrácie. Po aktivácii integrínových receptorov prisadnutím bunky na proteíny extracelulárnej hmoty ako fibronektín sa autofosforyluje kináza FAK a následne sa vytvorí komplex FAK-CAS-Src a je fosforylovaná substrátová doména proteínu CAS. Táto fosforylácia je kritická pre sprostredkovanie migrácie (*Cary et al., 1998*). Keďže asociácia FAK-CAS je sprostredkovaná SH3 doménou proteínu CAS (*Polte and Hanks, 1995*), predpokladali sme, že mutácia tyrozínu 12 v prvej väzbovej kapse SH3 domény bude afektovať bunkovú motilitu. Z migračných experimentov sme dostali prekvapivé výsledky. Expresia Y12E mutantného proteínu CAS v myších embryonálnych fibroblastoch výrazne zvýšila mieru migrácie na poly-lyzíne a mierne mieru migrácie na fibronektíne oproti MEF exprimujúcim nemutovanú variantu CAS. Na druhej strane expresia CAS Y12F mieru migrácie znižovala na oboch povrchoch. Migračná schopnosť CAS Y12F exprimujúcich MEF bola dokonca nižšia ako migrácia MEF neexprimujúcich CAS. Jednou z príčin zvýšenej motility CAS Y12E exprimujúcich MEF môže byť zvýšená asociácia proteínu CAS s proteínom BCAR3, ktorý ho lokalizuje na membránu a zvyšuje migráciu buniek – diskutované vyššie (*Schrecengost et al., 2007, Schuh et al., 2009*). Na druhej strane znížená motilita CAS Y12F exprimujúcich MEF môže byť spôsobená silnejšou asociáciou proteínu

CAS s kinázou FAK a následnou hyperfosforyláciou substrátovej domény CAS, ktorú sme pozorovali. Toto je konzistentné s experimentami, ktoré ukázali, expresia tzv. FAK/Src chiméry (kináza FAK, ktorá má vymenenú vlastnú kinázovú doménu za kinázovú doménu Src) v FAK deficientných fibroblastoch spôsobila zvýšenú fosforyláciu substrátovej domény, čo bolo spojené s tvorbou nezvyčajne veľkých fokálnych adhézii na okrajoch buniek. Tento fenotyp bol spojený so zväčšenou adhezívnou silou a zníženou motilitou buniek (*Siesser et al., 2008*). Spojenie hyperfosforylácie substrátovej domény proteínu CAS so zníženou motilitou bolo zaznamenané ešte v niekoľkých prípadoch. U STAT3 deficientných keratinocytoch bola hyperfosforylácia substrátovej domény CAS spojená s väčším počtom fokálnych adhézii, väčšou adhezivitou, rýchlejším rozprestieraním a zníženou motilitou keratinocytov (*Kira et al., 2002*). Taktiež v PTP-PEST deficientných fibroblastoch bola pozorovaná hyperfosforylácia substrátovej domény, následkom čoho bolo opäť zvýšené množstvo fokálnych adhézii, rýchlejšie rozprestieranie a znížená motilita oproti fibroblastom normálne exprimujúcim PTP-PEST (*Angers-Loustau et al., 1999*). Z vyššie uvedeného sa zdá, že pre normálnu funkciu proteínu CAS je dôležitá jednak jeho lokalizácia v rôznych častiach bunky a taktiež vyvážená miera fosforylácie substrátovej domény.

Ďalším procesom, v ktorom hrá CAS významnú úlohu je bunková invazivita. CAS potencuje schopnosť myších embryonálnych fibroblastov transformovaných Src527F invadovať cez matrigel. Zvyšovanie invazívnych schopností buniek je spojené so zvýšením celkovej tyrozínovej fosforylácie integrín asociovaných Src substrátov, zvýšením produkcie matrixovej metaloproteázy MMP2 a zvýšenou tvorbou veľkých aktín-bohatých podozomových agregátov (*Brábek et al., 2004*). Naše výsledky z testov invazivity Src527F transformovaných MEF boli konzistentné s výsledkami z migračných esejí. CAS Y12E exprimujúce MEF+Src527F mali najvyššiu invazívnu kapacitu v porovnaní s ostatnými líniami a zároveň CAS Y12F exprimujúce MEF+Src527F mali invazívnu schopnosť najnižšiu. Jednou z možných príčin rôznych invazívnych schopností je rozdiel v produkcii enzýmov degradujúcich extracelulárnu hmotu. Keďže exprimovanie proteínu CAS s deletovanou SH3 doménou spôsobilo zníženie produkcie MMP2 a mierne aj znížilo invazívne schopnosti Src transformovaných MEF (*Brábek et al., 2005*), predpokladali sme, že za zníženou schopnosťou CAS Y12F exprimujúcich MEF+Src527F invadovať bude znížená produkcia matrixovej metaloproteázy MMP2 poprípade ďalších

degradačných enzýmov. Prekvapivo sme však nezistili žiadny rozdiel v expresii či aktivácii MMP2 ani v degradácii želatínu in situ v Src transformovaných MEF expriomujúcich jednotlivé varianty proteínu CAS.

Ďalším možným vysvetlením rozdielu v migračnej i invazívnej kapacite myších embryonálnych fibroblastov je rozdielna dynamika cytoskeletu. S dynamikou cytoskeletu úzko súvisí dynamika fokálnych adhézii, pretože tieto štruktúry sú priamo napojené na aktínové vlákna a úzko spolu súvisia (zhrnuté v (*Zamir and Geiger, 2001*)). Dynamika fokálnych adhézii samozrejme priamo súvisí s bunkovou migráciou. Saunders a spolupracovníci dokázali, že zvýšenie dynamiky fokálnych adhézii vo vinculin deficientných fibroblastoch spôsobilo zvýšenie ich migračnej kapacity (*Saunders et al., 2004*). Zníženie dynamiky FA inhibíciou ErbB2 signalizácie po osi FAK-Src u vysoko metastatickej línie MDA-231 taktiež inhibovalo ErbB2 sprostredkovanú invazivitu (*Xu et al., 2009*). CAS sa priamo podieľa na regulácii dynamiky fokálnych adhézii. Myšie embryonálne fibroblasty, ktoré neexprimujú proteín CAS mali síce rovnakú rýchlosť inkorporácie paxilínu do FA (paxilín empiricky zvolený ako marker dynamiky FA) ako MEF normálne exprimujúce proteín CAS, avšak rýchlosť disociácie paxilínu a tým aj rozpadu fokálnych adhézii bola 19 krát nižšia (*Webb et al., 2004*). Pre zisťovanie dynamiky fokálnych adhézii sme zvolili dva prístupy. Prvým prístupom analyzovania dynamiky celých fokálnych adhézii bola interferenčná reflexná mikroskopia. Pomocou tejto techniky bol tiež analyzovaná úloha vinculinu pre životnosť fokálnych adhézii (*Saunders et al., 2004*). Výsledky získané pomocou IRM boli opäť konzistentné s migračnými a invazívnymi esejami. CAS Y12E exprimujúce myšie embryonálne fibroblasty mali mierne zvýšenú mieru vzniku i zániku FA oproti MEF exprimujúcim nemutovanú variantu proteínu CAS. Na druhej strane CAS Y12F exprimujúce MEF mali mierne zníženú mieru vzniku FA, pričom však mali výraznejšie zníženú mieru rozpadu FA a tým aj väčšiu stabilitu. Zdá sa, že podobne ako pri fosforylácii substrátovej domény CAS, kde bolo dôležité presné vyladenie miery fosforylácie a defosforylácie tyrozínov v YxxP motívov (motilitu buniek blokovala jednak expresia CAS s nefosforylovateľnou substrátovou doménou a jednak jej hyperfosforylácia), je kriticky dôležité aj rovnovážne množstvo proteínu CAS, keďže jeho absencia vo fokálnych adhéziách tak isto ako zvýšená asociácia s FA znižuje ich dynamiku.

Ako druhý prístup sme zvolili Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). Pomocou tejto metódy sme zisťovali dynamiku jednotlivých fluorescenčne

značných proteínových komponentov fokálnych adhézii – samotného proteínu CAS a vinculinu. Dynamika jednotlivých proteínov tvoriacich fokálne adhérie priamo súvisí s dynamikou FA ako takých. Predĺženie $T^{1/2}$ (čas potrebný na dosiahnutie hodnoty polovičnej intenzity fluorescencie plató vo vysvietenej oblasti) čiže zníženie dynamiky paxilinu vo FAK deficientných keratinocytoch malo za následok celkovo statickejší cytoskelet a zníženie miery rozpadu fokálnych adhézii čo vyústilo do defektov v migrácii keratinocytov, pričom však tvorba lamelipódií ostala nezmenená (*Schober et al., 2007*). Z našich dát z FRAP experimentov vyplýva, že $T^{1/2}$ u GFP značených variant CAS proteínu (Y12F a WT) získaných vysvietením fokálnych adhézii buniek línie K4 je 4 sekundy, čo je konzistentné s výsledkami iných výskumných skupín (*Donato et al., 2010*) avšak miera návratu fluorescencie týchto dvoch variant sa výrazne líši. U nemutovaného CAS je to 70% pričom u nefosforylovateľnej mutácie je to len 37%, čo naznačuje, že proteín CAS sa podobne ako iné proteíny fokálnych adhézii pravdepodobne nachádza v mobilnej a stabilne viazanej frakcii (*Wolfenson et al., 2009*) a CAS Y12F varianta je pravdepodobne stabilnejšie viazaná do fokálnych adhézii než nemutovaná forma. Keďže CAS Y12E mal výrazne zníženú lokalizáciu do fokálnych adhézii, pre získanie informácie o dynamike CAS Y12E boli pre vysvietenie a následný FRAP experiment použité podozomy opäť u buniek línie K4. U podozomov sme zistili, že fosfomimikujúca mutácia má výrazne väčšiu dynamiku ($T^{1/2} = 1,8$ s) než nemutovaná forma CAS WT. Ďalším proteínom analyzovaným pomocou FRAP bol vinculin. Vinculin je proteín fokálnych adhézii, ktorý má významnú úlohu pri ich stabilizovaní (*Saunders et al., 2006*) a preto jeho dynamika tiež priamo súvisí s dynamikou fokálnych adhézii. Pre FRAP experimenty sme pripravili YFP značený vinculin a následne sme ho transfekovali do Src527F transformovaných myších embryonálnych fibroblastov exprimujúcich varianty proteínu CAS (CAS WT, Y12E, Y12F). U MEF exprimujúcich nemutovanú formu CAS mal YFP vinculin vo fokálnych adhéziách $T^{1/2}$ rovnajúci sa 14,6 sekundám, pričom k podobným hodnotám sa dospelo aj v primárnych osteoblastoch pri použití GFP značeného vinculinu (*Tan et al., 2010*). Exprimovanie fosfomimikujúcej varianty CAS Y12E v Src transformovaných MEF spôsobilo zvýšenie dynamiky vinculinu ($T^{1/2} = 9,5$ s) pričom na druhej strane exprimovanie CAS Y12F zase spôsobilo stabilnejšiu väzbu vinculinu do FA ($T^{1/2} = 24,5$ s). S ohľadom na to, že prítomnosť vinculinu stabilizuje FA sú výsledky získané

pomocou FRAP experimentov konzistentné s predchádzajúcimi tvrdeniami o efektoch mutácie tyrozínu 12 na migráciu a invazivitu fibroblastov.

Z výsledkov tejto diplomovej práce vyplýva dôležitosť fosforylačného stavu tyrozínu 12 v prvej hydrofóbnej väzbovej kapse SH3 domény proteínu CAS na bunkové deje sprostredkované týmto adaptorovým proteínom. Z dát vyplýva, že CAS s nefosforylovaným Tyr12 je pevnejšie viazaný do fokálnych adhézii a stabilizuje ich. Na druhej strane fosforylácia Tyr12 spôsobí zníženie asociácie s FA, rozpad komplexu FAK-CAS-Src a následne destabilizáciu FA. Efektívna destabilizácia FA fosforyláciou Tyr12 pravdepodobne prispieva k regulácii mechanizmu rozpadu FA, ktorý je dôležitý pre efektívnu motilitu buniek. Ďalším možným smerovaním výskumu by mohla byť identifikácia proteín kinázy zodpovednej za fosforyláciu tohoto kritického tyrozínu. Ako možní kandidáti by mohli byť kinázy Src či ERK, ktoré sú dôležité pre reguláciu rozpadu fokálnych adhézii (*Webb et al., 2004, Vomastek et al., 2007*) alebo taktiež kináza Bmx/Etk, ktorá reguluje reorganizáciu aktinového cytoskeletu a bunkovú migráciu (*Abassi et al., 2003*).

Zhrnutie

- Boli pripravené vektory, nesúce fragmenty DNA kódujúce nemutovaný protein CAS ako aj mutantné verzie – fosfomimikujúcu mutáciu Tyr12→Glu (Y12E) a nefosforylovateľnú mutáciu Tyr12→Phe (Y12F). DNA kódujúca tieto varianty bola jednak vložená do vektoru pIRESpuro pre tvorbu myších embryonálnych fibroblastov stabilne exprimujúcich protein CAS alebo do vektoru pEGFP-C1 pre získanie proteínu CAS fúzaného s GFP.
- Pomocou pIRESpuro vektoru boli pripravené myšie embryonálne fibroblasty i Src527F transformované myšie embryonálne fibroblasty exprimujúce varianty proteínu CAS (WT, Y12E, Y12F), ktoré boli následne používané pre experimenty.
- V pripravených líniiach myších embryonálnych fibroblastov netransformovaných i Src527F transformovaných bol sledovaný vplyv mutácie tyrozínu 12 na fosforyláciu Src-asociovaných substrátov. Fosfomimikujúca mutácia Y12E spôsobovala zníženie množstva fosforylácie na tyrozínoch 397 a 861 u kinázy FAK avšak nemala výraznejší vplyv na fosforyláciu tyrozínu 118 u paxilínu. Mutácia Y12F však nemala oproti nemutovanej forme CAS žiadny efekt na fosforyláciu Src substrátov.
- Ďalším krokom bola analýza vplyvu mutácie tyrozínu 12 na fosforylačný stav substrátovej domény proteínu CAS. V tomto prípade sa fosfomimikujúca mutácia neprejavila oproti nemutovanému proteínu CAS. Na druhej strane nefosforylovateľná mutácia Y12F zvyšovala fosforyláciu tyrozínov v substrátovom doméne proteínu CAS.
- Pomocou GFP značeného proteínu CAS sme analyzovali vplyv mutácie Tyr12 na jeho lokalizáciu. Výmena tyrozínu 12 za fenylalanín nemá žiadny efekt na lokalizáciu CAS a tento lokalizuje do fokálnych adhézii i do podozómov. Avšak výmena tyrozínu 12 za fosfomimikujúci glutamát spôsobila výraznú

delokalizáciu CAS z fokálnych adhézii pričom však nemala žiadny efekt na lokalizáciu CAS do podozómov.

- Pri analýze úlohy fosforylácie tyrozínu 12 sme zistili, že fosfomimikujúca mutácia Y12E výrazne zvyšuje migračný potenciál MEF na poly-lyzíne. Táto mutácia zvyšuje migračný potenciál i na fibronektíne avšak zvýšenie nebolo až také výrazné. Naproti tomu nefosforylovateľná mutácia Y12F znižuje migračnú kapacitu MEF dokonca pod úroveň MEF neexprimujúcich proteín CAS. U Src transformovaných MEF boli dosiahnuté analogické výsledky avšak rozdiely neboli také markantné, keďže Src transformované MEF mali celkovo nižší migračný potenciál oproti netransformovaným MEF.
- Proteín CAS hrá významnú rolu i v procese invazivity Src transformovaných buniek. Z tohoto dôvodu sme sa rozhodli zistiť vplyv mutácie tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS na invazivitu Src transformovaných buniek. Zistili sme, že Y12E mutácia udeľuje Src527F transformovaným MEF zvýšenú invazívnu kapacitu v porovnaní s ostatnými líniami exprimujúcimi varianty proteínu CAS. Y12F mutácia výrazne znižuje schopnosť MEF+Src527F invadovať oproti Src transformovaným MEF exprimujúcim nemutovaný proteín CAS.
- Pre invazivitu Src transformovaných MEF, ktoré sú tzv. mezenchymálne invadujúce bunky, je dôležité vylučovanie enzýmov degradujúcich extracelulárnu hmotu. Preto sme ďalej analyzovali vplyv mutácie tyrozínu 12 na vylučovanie týchto proteáz. Z analýzy vyplýva, že mutácia tyrozínu 12 nemá žiadny efekt na vylučovanie matrixovej metaloproteázy 2 pretože všetky línie Src transformovaných MEF reexprimujúcich varianty CAS zvyšovali sekréciu MMP2 v rovnakej miere oproti Src transformovaným MEF neexprimujúcim proteín CAS. Keďže sme nezistili žiadny rozdiel v sekrécii MMP2, analyzovali sme celkovú degradáciu extracelulárnej hmoty, avšak Src transformované MEF reexprimujúce jednotlivé varianty proteínu CAS sa nelíšili navzájom od seba ani v celkovej degradácii želatínu in situ.

- Po tom čo sme nezistili žiadny rozdiel v sekrécii degradačných enzýmov Src-transformovaných MEF rozhodli sme sa preskúmať dynamiku kontaktov medzi bunkou a podkladom. Expresia fosfomimikujúcej mutácie Y12E v myších embryonálnych fibroblastoch mierne zvyšuje potenciál buniek tvoriť fokálne adhérie v porovnaní s expresiou nemutovaného CAS i expresiou nefosforylovateľnej Y12F mutácie. K rovnakým výsledkom sme dospeli i pri skúmaní miery zániku FA, avšak s tým rozdielom, že u MEF reexprimujúcich Y12F mutantnú variantu CAS bola schopnosť fibroblastov rozkladať vlastné FA výraznejšie znížená. Z týchto výsledkov sme vyvodili záver, že nefosforylovaný CAS stabilizuje fokálne adhérie. Následná FRAP analýza preukázala, že mutácia tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS za fenylalanín spôsobí vo vysvietených fokálnych adhériách nižší návrat celkovej fluorescence v porovnaní s nemutovaným CAS, čo je pravdepodobne následok väčšej frakcie CAS Y12F stabilne viazanej vo fokálnych adhériách. Pri následnom FRAP experimente s YFP-vinculinom exprimovaným v Src527F transformovaných MEF sme ukázali, že vinculin v Src transformovaných MEF reexprimujúcich CAS Y12E má najväčšiu dynamiku asociácie s FA a disociácie od nich v porovnaní MEF+Src527F reexprimujúcimi CAS WT i CAS Y12F, v ktorých mal vinculin dynamiku najmenšiu.
- Výsledky prezentované v tejto diplomovej práci v širšom spektre prispeli k objasneniu role tyrozínovej fosforylácie v SH3 doméne ako všeobecnému regulačnému mechanizmu interakcie proteínov v eukaryotických bunkách. V užšom spektre pomohli popísať význam fosforylácie tyrozínu 12 v SH3 doméne proteínu CAS ako nového regulačného mechanizmu bunkových dejov sprostredkovaných práve proteínom CAS ako napríklad bunková migrácia, invazivita a taktiež dynamika s cytoskeletom asociovaných štruktúr akými sú fokálne adhérie.

Literatura

Abbasi Y.A., Rehn M., Ekman N., Alitalo K. and Vuori K.
p130Cas couples the tyrosine kinase Bmx/Etk with regulation of the actin cytoskeleton and cell migration.

J. Biol. Chem. 2003 278(37) 35636-35643

Adzhubei A.A., and Sternberg M.J.E.

Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins.

J.Mol.Biol. 1993 229(2):472-493

Agrawal V, Kishan K.V.

Promiscuous binding nature of SH3 domains to their target proteins.

Protein Pept Lett. 2002 9(3):185-93. Review

Almeida E.A.C., Ilić D., Han Q., Hauck Ch.R., Jin F., Kawakatsu H., Schlaepfer D.D., and Damsky C.H.

Matrix survival signaling: From fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH₂-terminal kinase.

J Cell Biol. 2000 149(3):741-754.

Angers-Loustau A., Côté J-F., Charest A., Dowbenko D., Spencer S., Lasky L.A. and Tremblay M.L.

Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration and cytokinesis in fibroblasts.

J Cell Biol 1999 144(5):1019-1031

Brábek J., Mojzita D., Novotný M., Půta F. And Folk P.

The SH3 domain of Src can downregulate its kinase activity in the absence of the SH2 domain p-Y527 interaction.

Biochem Biophys Res Commun. 2002 296(3):664-670

Brábek J., Constancio S.S., Shin N.Y., Pozzi A., Weaver A.M. and Hanks S.K.

CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells.

Oncogene. 2004 23(44):7406-7415

Brábek J., Constancio S.S., Fonseca Siesser P., Shin N., Pozzi A. and Hanks S.K.

Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of Src-transformed cells.

Mol Cancer Res. 2005 3(6):307-315

Brinkman A., van der Flier S., Kok E.M. and Dorssers L.C.

BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells.

J Natl Cancer Inst. 2000 92(2):92-94

Booker GW, Gout I, Downing AK, Driscoll PC, Boyd J, Waterfield MD, Campbell ID.
Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit
of phosphatidylinositol 3-kinase.
Cell. 1993 73(4):813-22.

Cary L.A., Han D.Ch., Polte T.R., Hanks S.K. and Guan J-L.
Identification of p130^{Cas} as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell
migration.
J Cell Biol. 1998 140(1):211-221

Chan K.T., Cortesio Ch.L. and Huttenlocher A.
FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate
breast cancer invasion
J. Cell. Biol. 2009 185(2):357-370

Chen S., O'Reilly L.P., Smithgall T.E. and Engen J.R.
Tyrosine phosphorylation in the SH3 domain disrupts negative regulatory interactions
within the c-Abl kinase core.
J. Mol. Biol. 2008 383(2):414-423

Chodniewicz D. and Klemke R.L.
Regulation of integrin-mediated cellular response through assembly of a CAS/Crk
scaffold.
Biochim Biophys Acta. 2004 1692(2-3):63-76 Review

Cho S.Y. and Klemke R.L.
Extracellular-regulated Kinase activation and CAS/Crd coupling regulate cell
migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix.
J. Cell Biol. 2000 149(1):223-236

Defilippi P., Di Stefano P. and Cabodi S.
p130Cas: a versatile scaffold in signaling network.
Trends Cell Biol. 2006 16(5):257-263 Review

Dolfi F., Garcia-Guzman M., Onaniemi M., Nakanuta H., Matsuda M. and Vuori K.
The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling
pathway.
Proc Natl Acad Sci USA 1998 95(26):15394-15399

Donato M.D., Ryzhova L.M., Meenderink L.M., Kavarna I. and Hanks S.K.
Dynamics and mechanism of p130Cas localization to focal adhesions.
J. Biol. Chem. 2010 285(7):20769-20779

Erpel T., Superti-Furga G. And Courtneidge S.A.
Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding
surface are important for intra- and intermolecular interactions.
EMBO J. 1995 14(5):963-975

- Fischer E.H. and Krebs E.G.
Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts.
J Biol Chem. 1995 216(1):121-32.
- Fonseca P.M., Shin N., Brábek J., Ryzhova L., Wu J. and Hanks S.K.
Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation.
Cell Signal. 2003 16(5):621-629
- Garton A.J. and Tonks N.K.
Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST.
J Biol Chem. 1999 274(6):3811-3818
- Garton A.J., Flint A.J., and Tonks N.K.
Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic tyrosine phosphatase PTP-PEST.
Mol. Cell. Biol. 1996 16(11):6408-6418
- Garton A.J., Burnham M.R., Bouton A.H. and Tonks N.K.
Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130^{Cas} : a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition.
Oncogene. 1997 15(8):877-885
- Goetz J.G.
Bidirectional control of the inner dynamics of focal adhesions promotes cell migration.
Cell Adh. Migr. 2009 3(2):185-190
- Hakak Y. and Martin S.
CAS mediates transcriptional activation of the serum response element by Src
Mol. Cell. Biol. 1999 19(10):6953-6962
- Hanks S.K., Ryzhova L., Shin N. and Brábek J.
Focal adhesion kinase signaling activities and their implication in the control of cell survival and motility.
Front Biosci. 2003 8:d982-996
- Harte M.T., Macklem M., Weidow Ch.L., Pardone T., and Bouton A.H.
Identification of two focal adhesion targeting sequences in the adapter molecule p130^{Cas}.
Biochim Biophys Acta. 2000 1499(1-2):34-48
- Honda H., Nakamoto T., Sakai R. and Hirai H.
p130(Cas), an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration and cell spreading in fibroblasts.
Biochem Biophys Res Commun. 1999 262(1):25-30
- Honda H., Oda H., Nakamoto T., Honda Z., Sakai R., Suzuki T., Saito T., Nakamura K., Nakao K., Ishikawa T., Katsuki M., Yazaki Y. and Hirai H.
Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas.
Nat Genet 1998 19:361–365

- Kim J.E. and White F.M.
Quantitative analysis of phosphotyrosine signaling networks triggered by CD3 and CD28 costimulation in Jurkath cells
J.Immunol. 2006 176: 2833-2843
- Kira M., Sano S., Takagi S., Yoshikawa K., Takeda J. and Itami S.
STAT3 deficiency in keratinocytes leads to compromised cell migration through hyperphosphorylation of p130Cas.
J. Biol. Chem. 2002 277(15):12931-12936
- Kirsch K.H., Georgescu M-M. and Hanafusa H.
Direct binding of p130^{Cas} to the guanine nucleotide exchange factor C3G.
J Biol Chem. 1998 273(40):25673-25679
- Klemke R.L., Leng J., Molander R., Brooks P. C., Vuori K. And Cheresch D.A.
CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration.
J Cell Biol. 1998 140(4):961-972
- Kostic A. and Sheetz M.P.
Fibronectin rigidity response through Fyn and p130Cas recruitment to the leading edge.
Mol. Biol. Cell 2006 17:2684-2695
- Law S.F., Zhang Y-Z., Fashena S.J., Toby G., Estojak J. and Golemis E.
Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain.
Exp. Cell Research 1999 252: 224-235
- Li S., Couvillon A.D., Brasher B.B. and Van Etten R.A.
Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling.
EMBO J. 2001 20(23):6793-6804
- Lim W.A., Richards F.M. and Fox R.O.
Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains.
Nature. 1994 372(6504):375-379
- Liu F., Hill D.E. and Chernoff J.
Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the Src homology 3 domain of p130^{Cas}.
J Biol Chem. 1996 271(49):31290-31295
- Liu F., Sells M.A. and Chernoff J.
Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling.
Curr Biol. 1998 8(3):173-176

Luo W., Slebos R.J., Hill S., Li M., Brábek J., Amanchy R., Chaerkady R., Pandey A., Ham A.J. and Hanks S.K.

Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome.

J Proteome Res. 2008 7(8):3447-3460

Matsuda M., Mayer B.J., Fukui Y. and Hanafusa H.

Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins.

Science. 1990 248(4962):1537-1539

Meyer B.J., Hamaguchi M. And Hanafusa H.

A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C

Nature 1988 332(6161):272-275

Meyn M.A.3rd., Wilson M.B., Abdi F.A., Fahey N., Schiavone A.P., Wu J., Hochrein J.M., Engen J.R. and Smithgall T.E.

Src family kinases phosphorylate the Bcr-Abl SH3-SH2 region and modulate Bcr-Abl transforming activity.

J Biol Chem. 2006 281(41):30907-30916

Mochizuki N., Ohba Y., Kobayashi S., Otsuka N., Graybiel A.M., Tanaka S. And Matsuda M.

Crk Activation of JNK via C3G and R-Ras.

J Biol Chem. 2000 275(17):12667-12671

Musacchio A., Gibson T., Lehto V-P. And Saraste M.

SH3 – an abundant protein domain in search of a function.

FEBS Lett. 1992 307(1):55-61. Review

Musacchio A., Wilmanns M. and Saraste M.

Structure and function of the SH3 domain.

Prog Biophys Mol Biol. 1994 61(3):283-297. Review

Nakamoto T., Sakai R., Honda H., Ogawa S., Ueno H., Suzuki T., Aizawa S., Yazaki Y. and Hirai H.

Requirements for localization of p130^{Cas} to focal adhesions.

Mol Cell Biol. 1997 17(7):3884-3897

Nakamoto T., Yamagata T., Sakai R., Ogawa S., Honda H., Ueno H., Hirano N., Yazaki Y. and Hirai H.

Clz, a zinc finger protein that interacts with p130^{Cas} and activates the expression of matrix metalloproteinases.

Mol Cell Biol. 2000 20(5):1649-1658

Nojima Y., Morino N., Mimura T., Hamasaki K., Furuya H., Sakai R., Sato T., Tachibana K., Morimoto Ch., Yazaki Y. and Hirai H.

Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130^{Cas}, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs.

J Biol Chem. 1995 270(25):15398-15402

Nore B.F., Mattsson P.T., Antonsson P., Bäckesjö C.M., Westlund A., Lennartsson J., Hansson H., Löw P., Rönnstrand L., Smith C.I.
Identification of phosphorylation sites within the SH3 domains of Tec family tyrosine kinases.

Biochim Biophys Acta. 2003 1645(2):123-32.

Oktay M., Wary K.K., Dans M., Birge R.B. and Giancotti F.G.
Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH₂-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle.

J Cell Biol. 1999 145(7):1461-1469

Owen J.D., Ruest P.J., Fry D.W. and Hanks S.K.
Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2.

Mol Cell Biol. 1999 19(7):4806-4818

Polte T.R. and Hanks S.K.
Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130^{Cas}.

Proc Natl Acad Sci USA. 1995 92(23):10678-10682

Raftopoulou M. and Hall A.
Cell migration: Rho GTPases lead the way.

Dev Biol. 2004 265(1):23-32 Review

Reynolds A.B., Kanner S.B., Wang H.C. and Parsons J.T.
Stable association of activated pp60src with two tyrosine-phosphorylated cellular proteins.

Mol Cell Biol. 1989 9(9):3951-3958

Ruest P.J., Shin N., Polte T.R., Zhang X. And Hanks S.K.
Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src.

Mol Cell Biol. 2001 21(22):7641-7652

Sakai R., Iwamatsu A., Hirano N., Ogawa S., Tanaka T., Mano H., Yazaki Y. and Hirai H.

A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes *in vivo* with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner.

EMBO J. 1994 13(16):3748-3756

Saunders R.M., Holt M.R., Jennings L., Sutton D.H., Barsukov I.L., Bobkov A., Liddington R.C., Adamson E.A., Dunn G.A. and Critchley D.R.

Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover

Eur. J. Cell. Biol. 2006 85(6):487-500

Sawada Y., Tamada M., Dubin-Thaler B.J., Cherniavska O., Sakai R., Tanaka S. And Sheetz M.

Force sensing by extension of the Src family kinase substrate, p130Cas
Cell 2006 127 (5) 1015-1026

Schlaepfer D.D., Broome M.A. and Hunter T.

Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: Involvement of the Grb2, p130^{Cas} and Nck adaptor proteins.
Mol Cell Biol. 1997 17(3):1702-1713

Schober M., Raghavan S., Nikolova M., Polak L., Pasolli H.A., Beggs H.E. Reichard L.F. and Fuchs E.

Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics
J. Cell Biol. 2007 176(5):667-680

Schrecengost R.S., Riggins R.B., Thomas K.S., Guerrero M.S. and Bouton A.H. Breast Cancer Antiestrogen Resistance-3 expression regulates breast cancer cell migration through promotion of p130cas membrane localization and membrane ruffling.

Cancer Res. 2007 67(13):6174-6182

Schuh N.R., Guerrero M.S., Schrecengost R.S. and Bouton A.H.

Breast Cancer Antiestrogen Resistance-3 regulates Src/p130Cas association, Src kinase activity and breast cancer adhesion signaling.
J.Biol.Chem. 2010 285(4):2309-2317

Sidani M., Wessels D., Mouneimne G., Ghosh M., Goswami S., Sarmiento C., Wang W., Kuhl S., El-Sibai M., Backer J.M., Eddy R., Soll D. and Condeelis J.

Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells

J.Cell Biol. 2007 179(4):777-791

Sieg D.J., Ilić D., Jones K.C., Damsky C.H., Hunter T. and Schlaepfer D.D.

Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pytk2 does not fully function to enhance FAK⁻ cell migration.

EMBO J. 1998 17(20):5933-5947

Siesser P.M., Meenderink L.M., Ryzhova L., Michael K.E., Dumbauld D.W., García A.J., Kaverina I. and Hanks S.K.

A FAK/Src chimera with gain-of-function properties promotes formation of large peripheral adhesions associated with dynamic actin assembly.

Cell. Motil. Cytoskeleton. 2008 65(1):25-39

Sztacho M.

Funkční význam fosforylace tyrozínu 90 v SH3 doméně.

Diplomová práce, 2009, PřF UK v Praze

Tachibana K., Urano T., Fujita H., Ohashi Y., Kamiguchi K., Iwata S., Hirai H. and Morimoto Ch.

Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase.
J Biol Chem. 1997 272(46):29083-29090

Tamada M., Sheetz M.P. and Sawada Y.

Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch.
Dev. Cell. 2004 7:709–718.

Tan L., Meyer T., Pfau B., Hofmann T., Tan T.W. and Jones D.

Rapid vinculin exchange dynamics at focal adhesions in primary osteoblasts following shear flow stimulation.

J. Musculoskelet Neuronal Interact. 2010 10(1):92-99

Tanaka S. And Hanafusa H.

Guanine-nucleotide exchange protein C3G activates JNK1 by a Ras-independent mechanism.

J Biol Chem. 1998 273(3):1281-1284

Tikhmyanova N., Little J.L. and Golemis E.A.

Cas proteins in normal and pathological cell growth control.

Cell. Mol.Life Sci. 2009 67(7):1025-1048 Review

Vomastek T., Iwanicki M.P., Schaeffer H-J., Tarcsafalvi A., Parsons J.T. and Weber M.J.

RACK1 targets the Extracellular Signal-Regulated Kinase / Mitogen-Activated Protein Kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility.

Mol. Cell. Biol. 2007 27(23):8296-8305

Vuori K., Hirai H., Aizawa S. and Ruoslahti E.

Induction of p130^{Cas} signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases.

Mol Cell Biol. 1996 16(6):2606-2613

Webb D.J., Donais K., Whitmore L.A., Thomas S.M., Turner Ch.E., Parsons J.T. and Horwitz A.F.

FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly
Nat. Cell. Biol. 2004 6(2):154-161

Wisniewska M., Bossenmaier B., Georges G., Hesse F., Dangi M., Künkele K-P., Ioannidis I., Huber R. and Engh R.A.

The 1.1 Å resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity.

J Mol Biol. 2005 347(5):1005-1014

Wolfenson H., Lubelski A., Regev T., Klafter J., Henis Y.I. and Geiger B.
A role for the juxtamembrane cytoplasm in the molecular dynamics of focal adhesions.
Plos One 2009 4(1):e4304

Wu Y., Spencer S.D. and Lasky L.A.
Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein.
J Biol Chem. 1998 273(10):5765-5770

Wu X., Gan B., Yoo Y., Guan J.L.
FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation.
Dev Cell. 2005 9(2):185-96.

Xu Y., Benlimame N., Su J., He Q. and Alaoui-Jamali M.A.
Regulation of focal adhesion turnover by ErbB signalling in invasive breast cancer cells.
Br. J. Cancer 2009 100(4):633-643

Zamir E. and Geiger B.
Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.
J. Cell Sci. 2001 114:3583-3590 Commentary